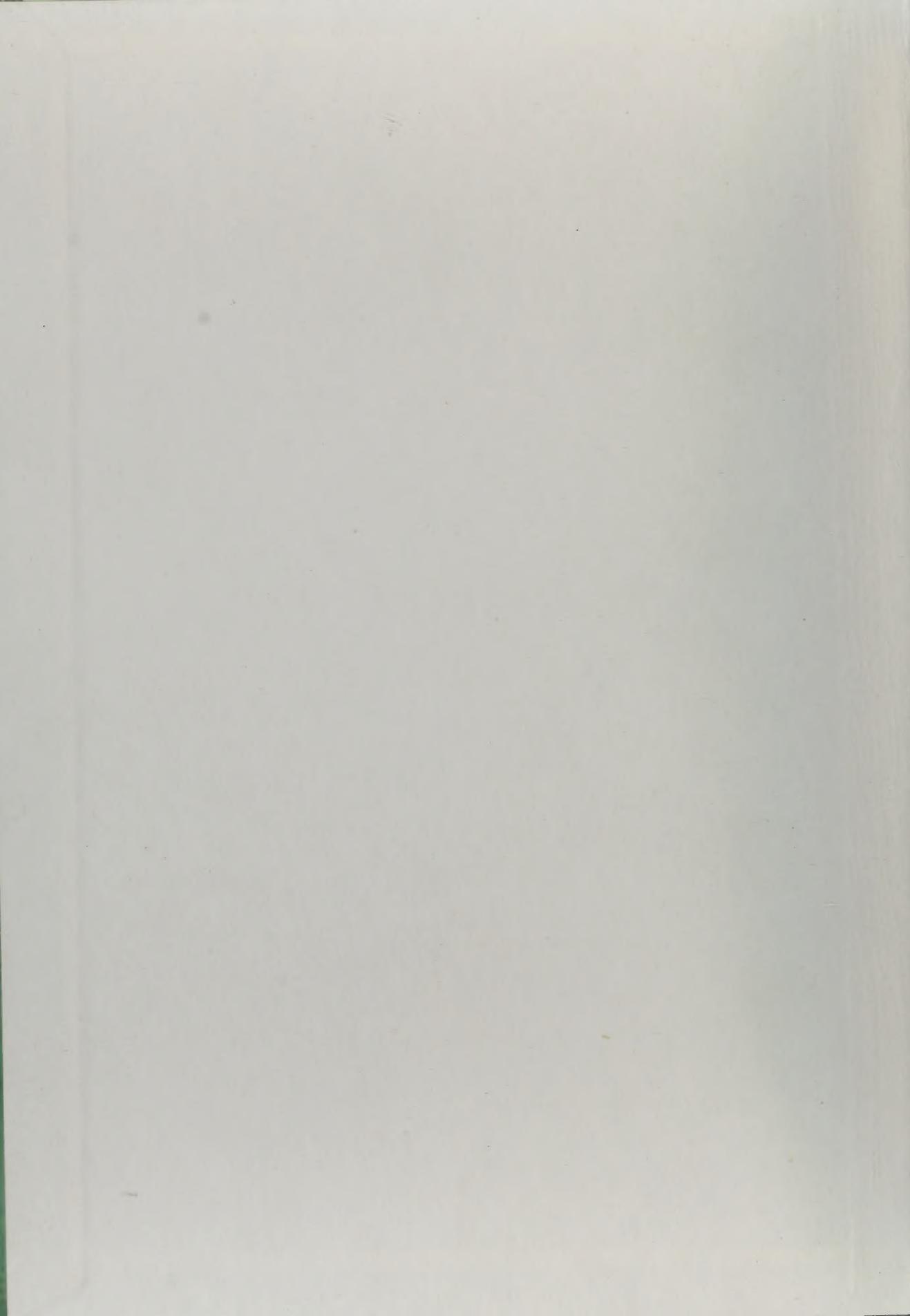


# 细胞色素P450 酶系的结构、 功能与应用前景

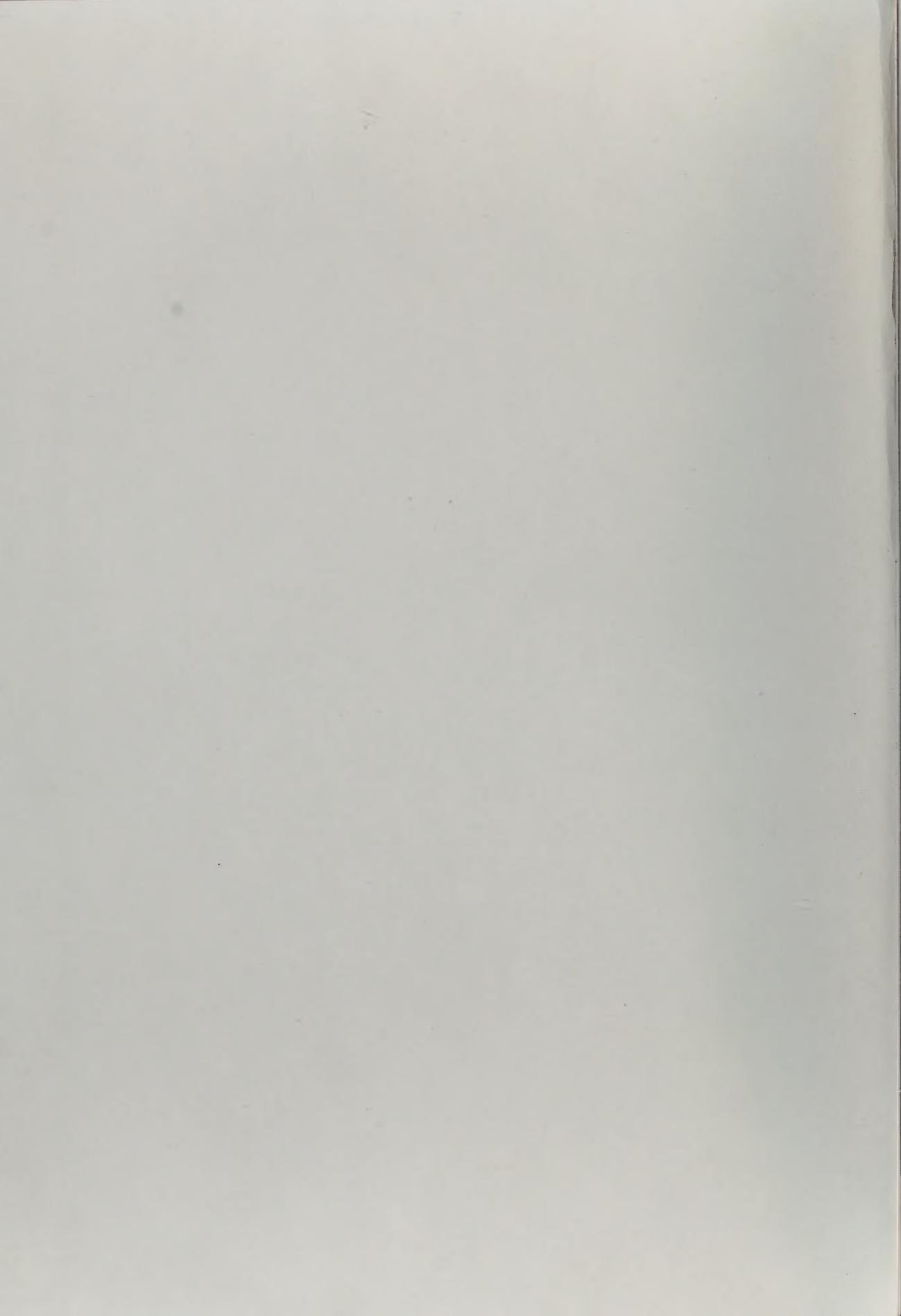
冷欣夫 邱星辉 编著

生 · 命 · 科 · 学 · 专 · 论

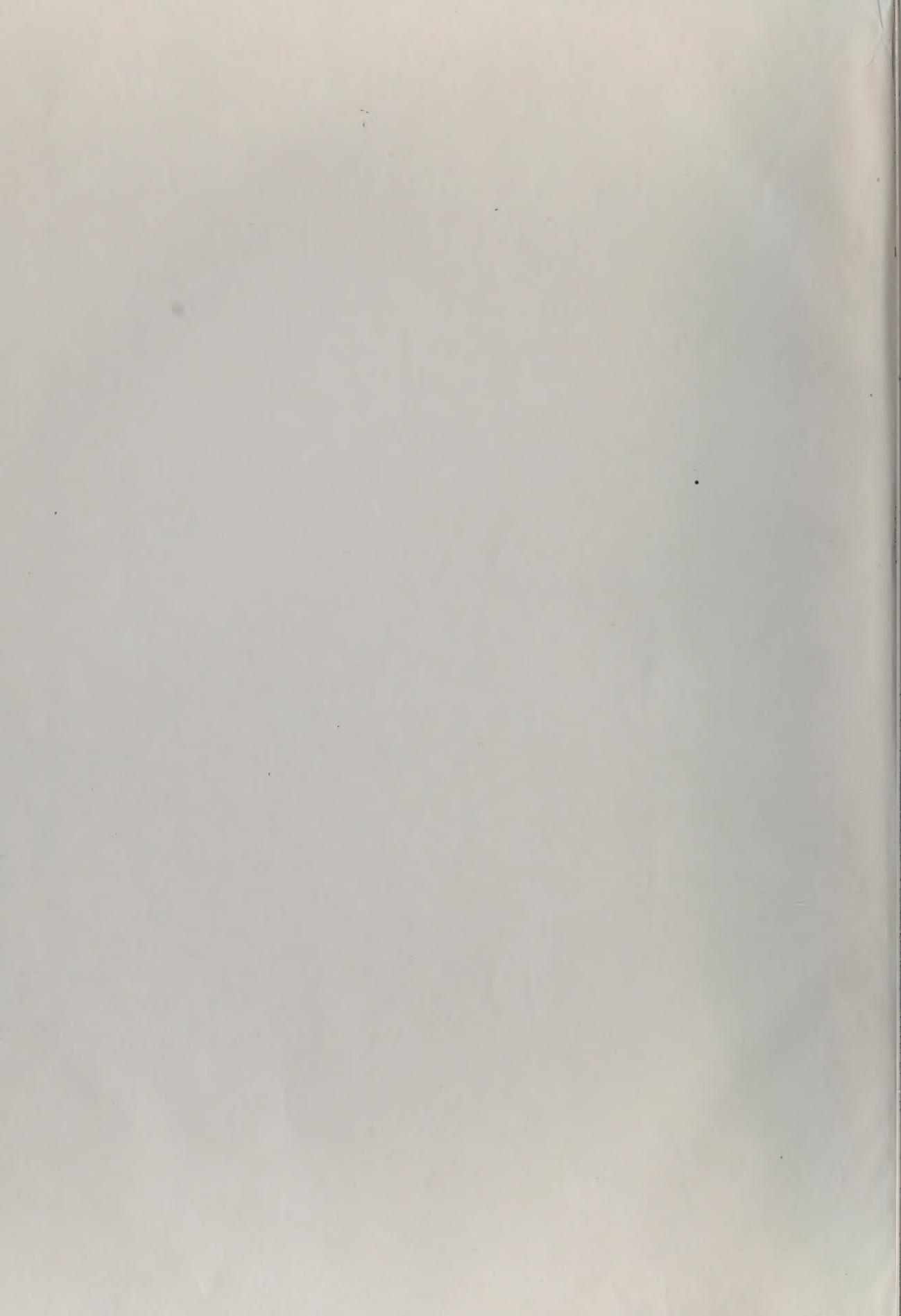
科学出版社







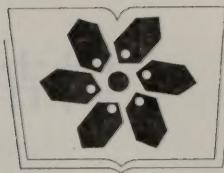




中国科学院植物研究所  
植物研究所图书馆  
30000-22

58-7437  
· 248

# 细胞色素 P450 酶系的 功能与应用前景



中国科学院科学出版基金资助出版

李化生、邢建民、姚春雷



27848



中国科学院植物研究所植物学图书馆



中科院植物所图书馆



S0003522

58.174359

248

# 细胞色素 P450 酶系的结构、功能与应用前景

冷欣夫 邱星辉 编著



# 科学出版社

2001

27844

## 内 容 简 介

本书介绍了生物体内重要的催化酶系——细胞色素 P450 的结构与组成、催化循环机理、催化反应类型、诱导-调控-抑制作用及应用发展前景。全书从 P450 酶系的基础知识和研究方法入手,介绍国内外该研究领域的最新研究进展,并融入作者自己的研究成果,以易于理解与掌握的语言将上述内容系统地展现给读者。

本书可供大学生物系师生或从事药理学、环保学和昆虫毒理学方面的工作者参考使用。

### 图书在版编目(CIP)数据

细胞色素 P450 酶系的结构、功能与应用前景 / 冷欣夫,  
邱星辉编著. —北京:科学出版社, 2001.5

ISBN 7-03-008990-1

I . 细… II . ①冷… ②邱… III . 细胞色素: 氧化还原酶  
IV . Q554

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2000)第 85276 号

科学出版社出版

北京东黄城根北街 16 号  
邮政编码: 100717

科地亚印刷厂印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

2001 年 5 月第 一 版 开本: 787×1092 1/16

2001 年 5 月第一次印刷 印张: 16 1/2

印数: 1—2 000 字数: 373 000

定价: 45.00 元

(如有印装质量问题, 我社负责调换(新欣))

## 序

细胞色素 P450, 是一类与重金属结合的配体, 形成的酶在生物细胞通过可逆性的变化而进行电子传递。因它与一氧化碳结合后, 在 450nm 处有吸收峰, 故有此名。该物质最早是在 1955 年从哺乳动物肝脏的微粒体中发现的。在昆虫中, 1965 年报道其存在, 以后有关的研究陆续增加, 至今有 90 种以上的昆虫出现有关细胞色素 P450 活动的报道, 并且查明了以 P450 单加氧酶系的氧活化成分参与生物界多种重要的代谢过程, 从简单的细菌到高等动物与植物, 普遍存在。近年来由于分子生物学技术的应用, 对 P450 的认识有极大的促进。90 年代以来, 每年发表有关的论文超过 2000 篇, 研究成果开始在农业、环保、医药以及生物学基础研究的各领域出现。

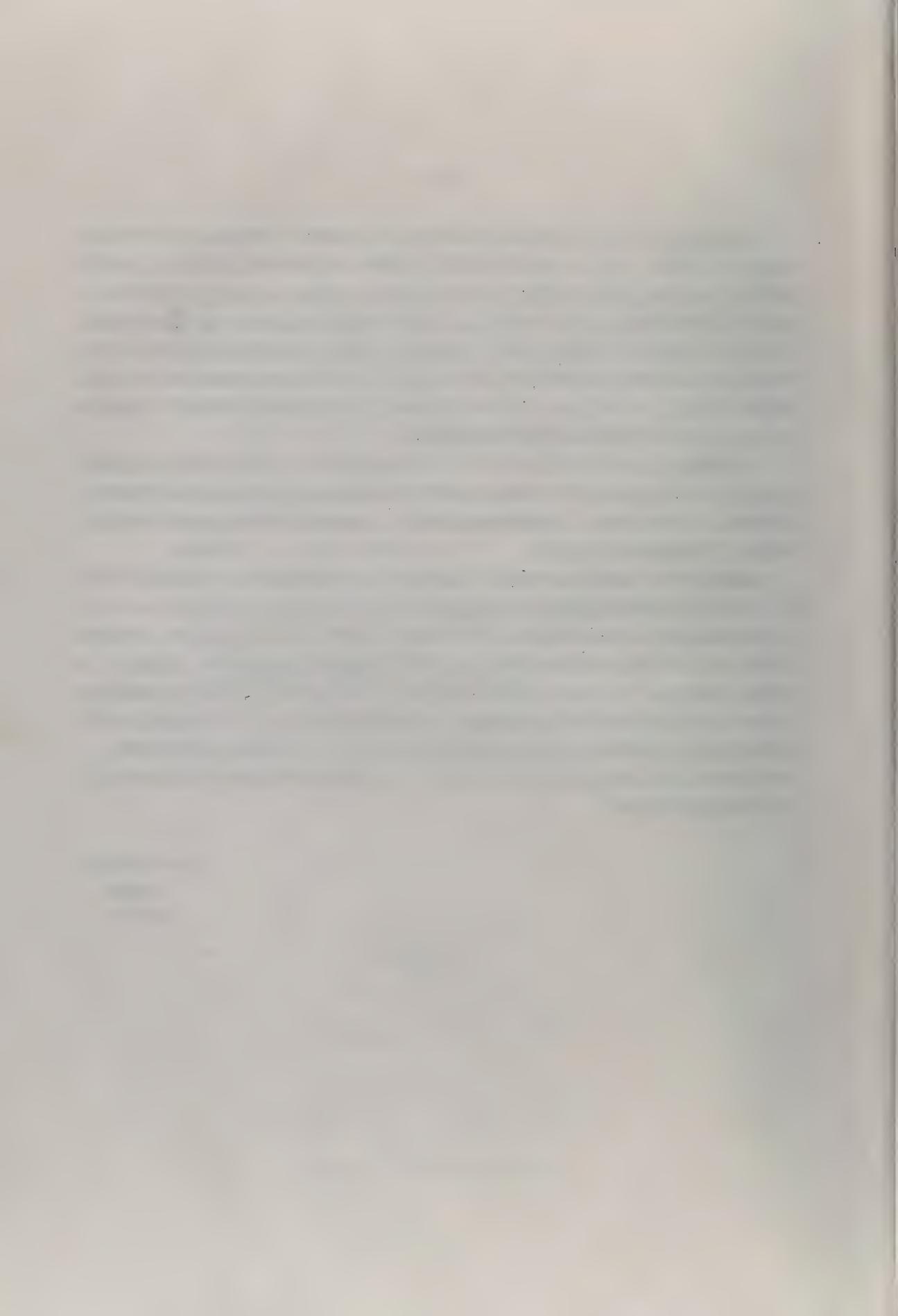
P450 酶系在昆虫中的作用, 涉及生长、发育、取食等过程, 它对异生物质的代谢特性造成了昆虫对杀虫剂的抗药性和对植物有毒物质的耐受性, 它还参与昆虫体内激素的合成和代谢。许多害虫防治工作的失败经验, 提高了人们对 P450 酶系在其中作用的认识, 并且促进了对此领域的研究发展。

细胞色素 P450 酶系作用的重要性已成为当代生物学研究中的一个值得注意的领域。我国在药理学和毒理学研究中的很多问题与它有密切的关系。因此出版一本专著, 全面系统地论述有关的基础理论和应用的可能性与重要性, 确实是当务之需。本书的两位作者多年从事于昆虫毒理学的研究工作, 积累了丰富的有关经验和学识, 写成此书, 内容充实, 可读性强。在 12 章内, 包括有细胞色素 P450 酶系的研究历史和发展、酶系组成和 P450 的结构及其循环催化底物的机理、不同生物类群中的 P450 种类和功能, P450 基因多样性及其表达调控机制, P450 与某些疾病的关系, 以及 P450 酶系的应用前景等。本书今由科学出版社出版, 是我国生物学界的一件大事, 预期将对高校师生和有关的专业研究人员做出重要的贡献。

中国科学院院士

钦俊德

2000 年夏



## 前　　言

在自然界的生物王国里,无论是脊椎动物或无脊椎动物(包括昆虫)、植物和微生物中,细胞色素 P450 酶系无所不在。在生命过程中,内源物质的代谢与转化或外源化合物的活化与降解等都需要细胞色素 P450 酶系的催化与调控。由于该酶系的性质和功能及其在生命活动中它的作用,因此在药理学和毒理学的研究中它一直是引人关注的重要研究领域。

细胞色素 P450 酶系的研究,已有 50 多年的历史,涉及内容广泛,又多是生物体内的些重要问题,因而其研究发展日新月异。特别是分子生物学和基因工程的迅速发展,对人类某些疾病的发生机制与 P450 基因表达调控机制以及农药的抗药性和环境污染物致癌机制已深入到分子水平。

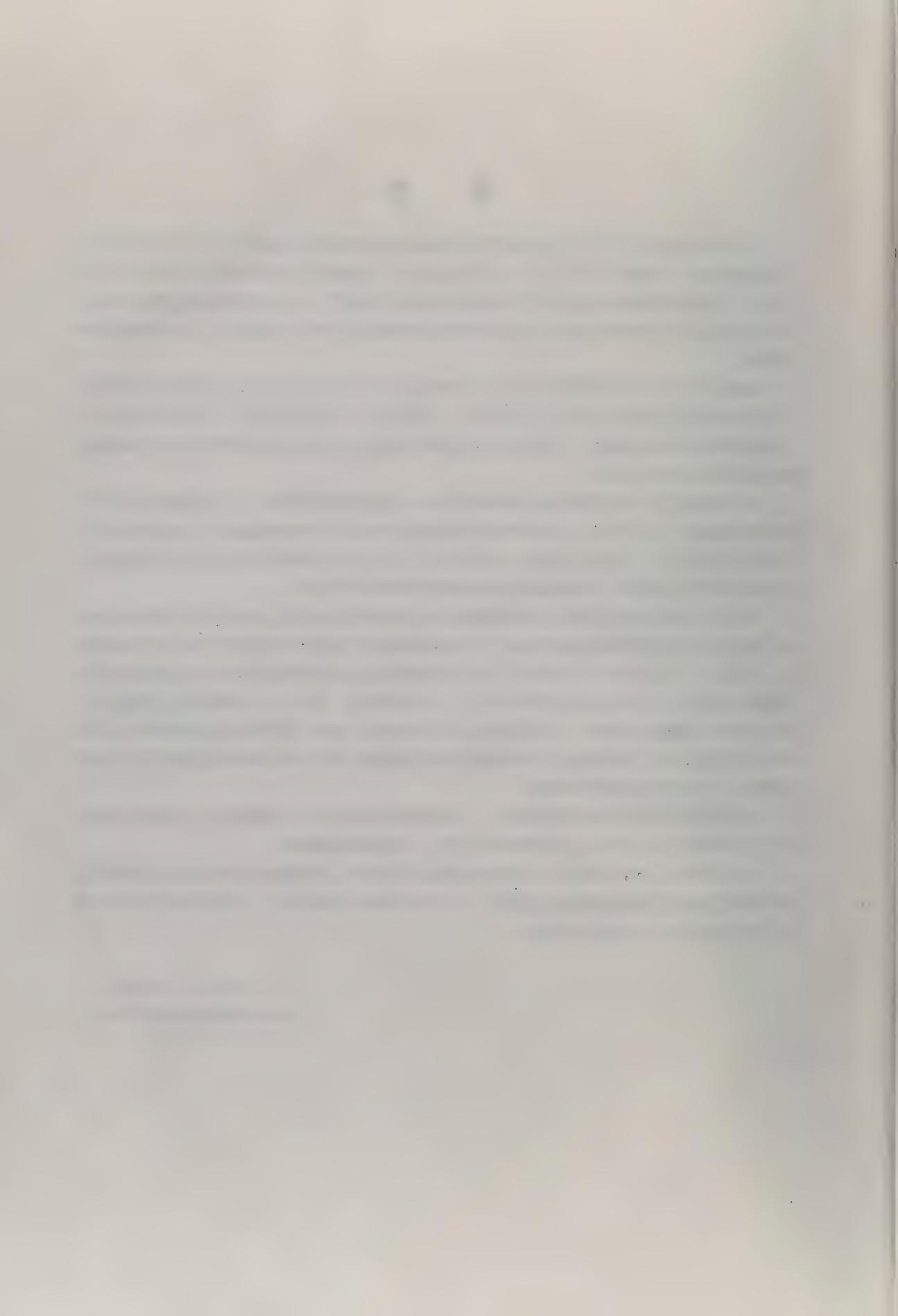
由于细胞色素 P450 酶系是生命科学中的一项重要研究领域,它又将是联系实际问题的研究基础。近些年来,我国在药理学和毒理学的研究中也涉及这方面的研究内容。因而有必要出版一本比较全面的专著;而且近 10 年来 P450 酶系的研究及其应用前景日趋活跃和扩展,也需要一本基础理论知识比较完整的参考专著。

本书共 12 章,内容主要包括细胞色素 P450 酶系的发展历史,P450 的分子结构、酶系的组成及其对底物的循环催化机制以及 P450 酶系分子生物学及基因工程研究方面的情况。凡此,均可见于有关内容的章节。关于 P450 酶系的生物功能和 P450 的表达调控与某些疾病的关系及其基因治疗等均分章(节)详细阐述。另辟 P450 酶系的应用前景一章,作为开拓该酶系应用的一些基础知识,其内容涉及 P450 循环催化途径的变革,以及 P450 基因在农业上品种的改良、环境保护中的生物除污和有机化学中的选择性合成中的应用等一些重要的发展研究领域。

本书承蒙钦俊德院士审阅并作序。书内的化学结构式和一些插图以及在编写中的技术工作等得到了李玉侠女士热情帮助和支持。在此均深表感谢。

也必须指出,由于文献较多,有些内容在编写过程中,可能漏缺;有些文献只收集到文章的摘要,因而文字叙述未能表达全意。由于本书的内容涉及面广,再加上我们的水平有限,书内错误之处,请读者多加指正。

冷欣夫 邱星辉  
中国科学院动物研究所,北京  
2000 年 4 月



# 目 录

## 序

## 前言

### 第一章 绪 论 ..... (1)

1.1 细胞色素 P450 研究简史 ..... (1)

1.2 细胞色素 P450 的多样性 ..... (2)

1.3 细胞色素 P450 功能重要性与应用前景 ..... (6)

参考文献 ..... (7)

### 第二章 细胞色素 P450 酶系组成及其循环催化机制 ..... (9)

2.1 细胞色素 P450 酶系组成与 P450 的分子特征 ..... (9)

2.2 细胞色素 P450 酶系的循环催化机制 ..... (16)

参考文献 ..... (28)

### 第三章 细胞色素 P450 的分离纯化 ..... (32)

3.1 哺乳动物细胞色素 P450 的分离纯化 ..... (32)

3.2 昆虫细胞色素 P450 的分离纯化 ..... (38)

3.3 植物细胞色素 P450 的分离纯化 ..... (39)

参考文献 ..... (40)

### 第四章 细胞色素 P450 的种类多样性及其进化 ..... (43)

4.1 细胞色素 P450 种类的多样性 ..... (43)

4.2 细胞色素 P450 的种系发生 ..... (45)

4.3 细胞色素 P450 的进化起源与数量壮大 ..... (47)

4.4 细胞色素 P450 的进化 ..... (52)

参考文献 ..... (54)

### 第五章 哺乳动物细胞色素 P450 及其功能 ..... (56)

5.1 哺乳动物细胞色素 P450 酶系对体内化合物的合成与代谢 ..... (57)

5.2 哺乳动物不同组织中的细胞色素 P450 及其功能 ..... (60)

参考文献 ..... (70)

### 第六章 细胞色素 P450 与某些疾病的关系 ..... (76)

6.1 细胞色素 P450 对肝病的影响 ..... (76)

6.2 肝脏疾病中 CYP 表达变化机制 ..... (80)

6.3 病毒感染、疫苗注射以及炎症因子对肝脏 P450 的影响 ..... (83)

6.4 甲状腺疾病 ..... (85)

6.5 垂体疾病和生长激素治疗 ..... (86)

6.6 其他疾病 ..... (86)

6.7 细胞色素 P450 和癌症 ..... (87)

参考文献 ..... (97)

---

第七章 植物细胞色素 P450 及其功能 .....	(107)
7.1 生物合成酶 .....	(112)
7.2 解毒酶 .....	(128)
参考文献 .....	(131)
第八章 昆虫细胞色素 P450 及其功能 .....	(140)
8.1 昆虫细胞色素 P450 基因 .....	(140)
8.2 昆虫细胞色素 P450 的表达 .....	(142)
8.3 昆虫细胞色素 P450 的功能 .....	(147)
参考文献 .....	(164)
第九章 微生物的细胞色素 P450 及其功能 .....	(172)
9.1 真菌的细胞色素 P450 及其功能 .....	(172)
9.2 细菌细胞色素 P450 .....	(178)
参考文献 .....	(181)
第十章 细胞色素 P450 基因表达调控机制 .....	(186)
10.1 细胞色素 P450 基因的诱导与调控 .....	(189)
10.2 细胞色素 P450 的抑制 .....	(198)
参考文献 .....	(200)
第十一章 细胞色素 P450 基因的异源表达系统 .....	(205)
11.1 哺乳动物细胞色素 P450 基因的异源表达系统 .....	(205)
11.2 昆虫细胞色素 P450 基因的异源表达系统 .....	(213)
11.3 植物细胞色素 P450 基因的异源表达系统 .....	(214)
参考文献 .....	(216)
第十二章 细胞色素 P450 的应用 .....	(224)
12.1 细胞色素 P450 应用的几个重要技术 .....	(224)
12.2 细胞色素 P450 的应用 .....	(229)
参考文献 .....	(248)

# 第一章 绪 论

P450 酶系曾被冠以多种名称: 多功能氧化酶、细胞色素 P450 酶系、加单氧酶 (monooxygenase)、芳香烃羟化酶和药物代谢酶等。它是广泛分布于动物、植物和微生物等不同生物体内的一类代谢酶系。细胞色素 P450 第一次出现于文献中是在 1962 年 (Omura, 1999)。细胞色素 P450 加单氧酶 (下简称 P450 酶系) 起中心作用的是细胞色素 P450 以及细胞色素 P450 还原酶, 因其主要组成的 P450 蛋白与 CO 的结合体在 450nm 处有特征光吸收峰而得名。P450 蛋白种类的多样性及其底物的重叠性使 P450 酶系可以催化多种类型的反应, 不仅对许多外来物质如杀虫剂及其他环境有毒物质具有代谢作用, 还参与一些起重要生理功能的内源性物质如激素、脂肪酸的代谢, 在生物体中起十分重要的作用。1963 年 P450 作为氧化酶的功能得以阐明后, 这一血红蛋白的研究发展很快, 出现在《生物学文摘》的有关 P450 的研究论文迅速上升 (Omura, 1999) (图 1.1)。由于 P450 酶系的生物学重要性, 自其发现以来, 该酶系的研究一直是药理学和毒理学中一个十分引人注目的领域。

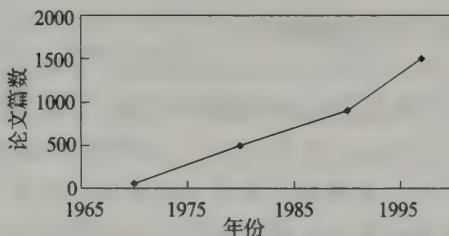


图 1.1 《生物学文摘》(*Biological Abstracts*) 中列出的 P450 研究的论文篇数

## 1.1 细胞色素 P450 研究简史

P450 酶系的研究已有 50 多年的历史 (Estabrook, 1996)。20 世纪 40~50 年代, 化学、药理学、生物化学、内分泌学和癌生物学的发展为这一领域的发展奠定了基础 (Estabrook, 1996)。50 年代的两项进展为 P450 的发现和鉴定起了十分关键的作用: ① 1955 年 Hayaishi 等和 Mason 等同时且独立地发现加氧酶 (oxygenase); ② Chance 创立了适用于细胞和细胞膜的浑浊悬浮液研究的快速而灵敏的分光光度技术, 在他的指导下于 1955 年发现大鼠肝微粒体被连二亚硫酸钠还原再通 CO 后在 450nm 处有吸收峰 (Klingenberg, 1958)。60 年代前 5 年 P450 及其生理功能的发现引发 60 年代后半期有关 P450 研究的迅速发展, 但由于条件的限制, 研究工作主要集中在对该血红蛋白的生物化学和生物物理学特征的鉴定及膜结合酶的酶学功能上 (Estabrook, 1996)。

20 世纪 70 年代, P450 酶系在致癌物代谢中的重要作用得到证实, 许多研究化学致癌的科学家转向细胞色素 P450 的研究, 带来这一研究的第二次大发展 (Omura *et al.*,

1993)。方法和技术的改进使增溶和纯化 P450 及重组 P450 酶系活性成为可能,由此证明了许多细胞色素 P450 在物理学和酶学性质的不同。纯化的 P450 可用于制备特定 P450 的抗体并由这些抗体来测定某一 P450 的存在和数量以及抑制特定的酶反应,对 P450 的化学反应机制可以作更深入的了解。

20 世纪 80 年代分子生物学技术的应用,对 P450 的认识有极大的促进,Fujii-Kuriyama 等(1982)克隆和测序肝 P450 基因之后,P450 基因克隆及其序列分析以及利用特异性探针测定影响 P450 分布和合成的因素,成为该领域研究的热点。80 年代的另一成就是 P450cam 晶体结构的确定,这为 P450 催化反应机制的了解奠定了基础(Poulos, 1985)。

90 年代,有关 P450 的研究得到了更广泛的开展,每年有关 P450 的研究论文超过 2000 篇,研究内容和对象都向多元化方向发展,P450 基因表达机制和 P450 结构与功能关系成为 90 年代研究的重点(Estabrook, 1996)。近 10 年来,P450 的研究成果已开始渗入农业、环境、医药及基础研究各领域。

## 1.2 细胞色素 P450 的多样性

细胞色素于 1958 年被发现以来,就引起了人们的广泛重视。它的广泛分布、多样的结构、复杂的功能及其基因的多层次调控可以说是其重要性的某些体现。

### 1.2.1 细胞色素 P450 分布的多样性

细胞色素 P450 首先在哺乳动物肝微粒体中发现,最初被认为它仅存在于动物组织的微粒体中(Omura *et al.*, 1993)。至 20 世纪 60 年代后期,细胞色素 P450 在微生物中的发现证明了这一血红蛋白在生物界的分布要比想象的广得多(Omura *et al.*, 1993)。至今已在各种动物、植物、真菌和细菌中都发现有 P450 的存在(Omura *et al.*, 1993)。

细胞色素 P450 不仅在不同种的生物中存在,在同种生物许多不同组织中也发现了 P450。脊椎动物的肝脏是 P450 含量最丰富的器官,在皮肤、肺、消化道等防御入口及肾、肾上腺皮质和髓质、睾丸、卵巢、主动脉和血小板等部位也被证明存在 P450。昆虫的许多器官或组织如中肠、脂肪体、马氏管甚至头壳中都发现有 P450 (Hodgson, 1985)。

细胞色素 P450 虽然在许多组织或器官中存在,但其分布具有一定的选择性:它们主要分布于外源化合物进入体内的主要入口的组织,这些组织是对经口经皮进入的外源化合物的第一道防线,如在哺乳动物中,它主要分布于肺、皮肤、肠道,以及氧化作用的重要场所——肝脏;在鱼类,主要分布于肺、肾和鳃;在昆虫中多存在于中肠、脂肪体和马氏管中,而以中肠含量最高(邱星辉和冷欣夫,2000)。可见 P450 的分布使其可以最大限度的发挥作用(唐振华,1990b)。

### 1.2.2 P450 结构的多样性

P450 以可溶性和膜结合两种形态存在于生物体内 (Omura *et al.*, 1993)。1967 年 Appleby 从大豆根瘤菌(*Rhizobium japonicum*)中证明一种可溶性 P450 的存在,随后一些

其他可溶性 P450 也相继被报道(Omura *et al.*, 1993)。可溶性 P450 分离纯化的便利使 Poulos 等于 1985 年获得第一个 P450 晶体(樟脑羟基化 P450, P450101, P450cam)成为可能(Poulos, 1985), 这为揭示 P450 结构与功能的关系及 P450 的作用机制奠定了基础(Estabrook, 1996)。

膜结合 P450 可分为微粒体和线粒体 P450 两种类型。有趣的是, 线粒体 P450 具有严格的底物专一性, 它代谢内源性甾醇类物质, 对外来物质无代谢作用(Omura *et al.*, 1993)。而其他 P450 特别是肝微粒体中的 P450 则具有非常宽而重叠的底物专一性(Porter and Coon, 1991)。

细胞色素 P450 的化学本质是蛋白质, 它不是一种蛋白而是分子质量在 46~60kDa(黄俊勇和冷欣夫, 1991)的结构类似而又不尽相同, 性质类似而又有差异的一族蛋白质(唐振华, 1990a)。人们渐渐发现来源于不同种, 或同种不同品系, 或同一品系不同组织的 P450, 其分子量、光谱特征、分布特点、免疫性质、氨基酸序列、调控机制及底物专一性是不尽相同的。分离纯化技术的发展, 为证明细胞色素 P450 同工酶的多样性提供了直接的证据, 如从大白鼠肝微粒体中至少鉴定出 6 种同工酶组分, 从抗性品系的家蝇腹部微粒体中分离出 4 个同工酶组分(黄俊勇和冷欣夫, 1991)。人们还发现, 同一动物在不同的发育时期 P450 的优势同工酶也不尽相同(黄俊勇, 冷欣夫, 1991)。

细胞色素 P450 的多样性归根结底是由其基因结构的多样性决定的。除少数例外, 每一 P450 基因几乎总是产生单一的 P450 蛋白(Nelson *et al.*, 1993)。P450 基因结构的多样性已从克隆测序的 P450 基因中得到证实, 至 1993 年已描述的基因包括分属于 31 种真核生物, 11 种原核生物的 36 个基因家族的 221 个基因(Nelson *et al.*, 1993)。近年来, 不断有新的成员归入 P450 这一古老的基因超家族, 至今已鉴定出 1000 多种来自植物、动物、细菌和酵母的 P450(Nelson, 1999)。

### 1.2.3 细胞色素 P450 功能的多样性

细胞色素 P450 酶系可能是自然界中最具催化作用多样性的生物催化剂(Coon *et al.*, 1996), 由于它的种类、催化反应类型的多样性及其催化底物的广谱性(表 1.1), Coon 等(1996)指出细胞色素 P450 这一习惯沿用的名称已不能很好的表示这一类物质, 因而提出用多样酶类(diversozymes)来命名这一血红蛋白家族。

表 1.1 已知和预测的细胞色素 P450 的多样性特征(Coon *et al.*, 1996)

类别	现知数量	预测的总数
P450 催化的化学反应类型	40	60
P450 底物	$10^3$	$>10^6$
P450 的诱导剂	200	$>10^3$
已鉴定的 P450 或 CYP	300	$10^3$
每种哺乳动物的 P450 或 CYP	30	60~450

### 1.2.3.1 P450 底物的多样性

P450 具有很广的底物谱(表 1.2),既包括许多外来物质如抗体、植物次生性物质以及合成的有机化合物,也包括多种甾醇和其他生理过程产生的脂类。底物的化学结构可以是极性的,也可能是非极性的。人类制造的环境化合物,估计已超过 200 000 种,其中大多数是 P450 的可能底物,还有许多可能作为 P450 不同同工酶的诱导剂或抑制剂(Porter and Coon, 1991)。有些参与甾醇转化的 P450 对底物有高度地选择性,而其他 P450 特别是肝微粒体的 P450 具有重叠的底物专一性(Porter and Coon, 1991)。

表 1.2 细胞色素 P450 的底物(Porter and Coon, 1991)

外来物	生理过程相关的物质
药物包括抗生素	甾醇
致癌物	类花生四烯酸
抗氧化剂	脂肪酸
添味剂	丙酮,丙酮醇
溶剂	脂过氧化氢
农药	类视黄酸
染料	
麻醉剂	
石油产品	
醇类	

### 1.2.3.2 P450 催化机制和反应类型的多样性

总体来看,P450 可以催化成千上万的反应,甚至对具有相似化学结构的底物也表现出多种反应类型(Guengerich, 1993)。P450 催化反应过程涉及多个步骤,其作用机制有多种。典型的反应是通过电子传递系统,将分子氧还原,并将其中的一个氧原子加到底物中,反应需 NADPH。



随生物所处环境的不同,P450 还有其他的催化机制 (Porter and Coon, 1991; Coon, 1992),如:

- 1) 在无氧情况下,还存在过氧化物支路,通过过氧提供氧原子使底物羟基化(无需 NADPH)。
- 2) 通过氧还原机制,但氧不加入底物中形成羟基化产物,而是形成超氧化物和过氧化氢。
- 3) P450 不完全是氧化催化剂,它还起还原催化作用。亚铁 P450 可提供电子,在无氧条件下进行分步反应。许多化合物如染料、N-氧化物、环氧化物都可接受 2 个电子而被还原。

因为 P450 具有多样的催化机制使 P450 酶系对多种底物表现出催化活性,P450 参与的反应可归为包括羟基化、过氧化、环氧化等在内的数十种类型(表 1.1)。

### 1.2.3.3 P450 反应生物学效应的两重性

细胞色素 P450 在生物体中具有重要的生理功能。有些通过 P450 的生物转化作用如胆固醇(cholesterol)转化成类皮质激素(corticoid)和性激素对生物体是必需的。一些疏水的外来物质,经 P450 催化反应后,形成极性更高的物质而更易被生物体直接排泄,或通过与水溶性物质如葡萄糖醛酸和谷胱甘肽结合后排除,这通常是解毒过程。在某些情况下,外来物质可能被转化为具细胞毒性、致突变性或致癌作用更强的物质,而起毒性活化作用(Porter and Coon, 1991)。

### 1.2.3.4 P450 结构与功能的关系

细胞色素 P450 表现出在底物和产物专一性方面的极大多样性(Negishi *et al.*, 1996)。P450 总体上表现出较宽的底物专一性,但就某一 P450 往往具有较高程度的底物和产物专一性特征。这种看似矛盾的特征是由 P450 的结构决定的。通过对 P450 分子的三级结构的比较研究表明,P450 的“底物-血红素囊(substrate-heme pocket)”在结构上的可塑性(flexibility)使 P450 可能与多种底物结合,而这种结构的可塑性是由“底物-血红素囊”关键位置上的氨基酸残基控制的。定点突变和以 cDNA 为模板的表达试验证明,这些残基对 P450 活性具有重要作用(Negishi *et al.*, 1996)。一个典型的例子是小鼠 P4502a-4/2a-5 系统,P4502a-5 在底物-血红素囊上的一个氨基酸替代,使 P4502a-5 的香豆素 7-羟基化活性变为 P4502a-4 的睾酮(testosterone)15a-羟基化活性(Lindberg and Negishi, 1989)。不同的 P450 尽管存在结构上极其保守的核,氨基酸序列的差异使任意两个 P450 的结构都有所不同,P450 结构上的差异是 P450 多样活性的内在原因(Graham-Lorence and Peterson, 1996)。

### 1.2.4 P450 基因表达调控的多样性

真核生物的基因表达包括了基因的激活和转录,初始转录物的加工,mRNA 由细胞核运送到细胞质,由 mRNA 翻译合成蛋白质和蛋白质初级加工成熟,产生有生物功能的蛋白质等主要过程,基因表达的每个步骤都存在调控问题(唐振华和胡刚,1993)。P450 基因转录活性的调节是最常见,但不是惟一的表达调节机制(Porter and Coon, 1991; Coon *et al.*, 1992)(表 1.3)。在 P4502E1 基因表达调控上涉及转录和多种转录后机制(Coon *et al.*, 1992)。P4502E1 基因可因饥饿导致转录活化,而伴随糖尿病的发生出现的 mRNA 含量增加 10 倍是由于 RNA 稳定的结果。如用乙醇、丙酮及咪唑可诱导 2E1 蛋白,但 mRNA 含量并无变化,因此 2E1 的诱导可能是由于配体结合使酶免遭磷酸化和降解所致(Porter and Coon, 1991)。

即使是亲缘关系较近的 P4501A1 和 1A2,都有不同的基因调节机制。因 P4501A1 的酶活性可能与肺癌有关,其基因表达调控备受重视(冷欣夫,1996),成为目前研究最为深入的一种 P450(Porter and Coon, 1991)。P4501A1 属于可被多环芳烃(PAH)诱导的基因家族成员,这一基因的 5' 侧翼区包括几个短核苷酸序列,被称作异生素响应元件(xenobiotic responsive elements, XRE)。当在培养的细胞中加入芳烃水解酶受体(Ah 受体)的

配体(ligands),如 TCDD(2,3,7,8 -四氯二苯-对-二噁英)时,TCDD 与某些动物体内的 Ah 受体结合,释放出热激蛋白(hsp90),使受体-TCDD 复合物与芳烃受体核转移酶(ARNT)结合进入细胞核(冷欣夫,1996),再与 P4501A1 基因的 XRE 结合,基因的转录活性加强(Porter and Coon,1991)。而 P4501A2 可被 PAH 强烈诱导,但其基因的 5'-侧翼区无 XRE 序列。用不同的 PAH 处理后,1A2 mRNA 含量增加 20~40 倍已被证明大多数情况下是由于转录后机制——通过 mRNA 的稳定性和 1A2 mRNA 前体的加工所致,Ah 受体可能参与这一转录后诱导过程(Porter and Coon,1991)。

细胞色素 P450 基因的表达控制是生物体体内和体外多种因素相互作用的结果(唐振华和胡刚,1993)。一个基因的表达往往涉及多个步骤,从而使 P450 基因的表达调控呈现错综复杂的格局(唐振华和胡刚,1993)。

表 1.3 P450 基因表达调控的多样性(Coon *et al.*, 1992)

调节步骤	P450 举例
转录	1A1, 1A2, 2B1, 2B2, 2C7, 2C11 2C12, 2D9, 2E1, 2H1, 2H2, 3A1/2 3A6, 4A1, 11A1, 11B1, 17C1, 22E1
加工和 mRNA 稳定	1A1, 1A2, 2B1, 2B2, 2C12, 2E1 2H1, 2H2, 3A1/2, 11A1
翻译和酶稳定	2E1, 3A1/2, 3A6

### 1.3 细胞色素 P450 功能重要性与应用前景

细胞色素 P450(CYP)吸引人们的注意不仅在于它参与许多生物过程,也因为它催化作用的独特的化学——涉及分子氧的还原和分裂(scission),氧被固定在底物中。CYP 催化作用的化学方面虽经广泛研究,但尚未完全了解。活性中心的蛋白结构决定不同 P450 的底物选择性。

P450 的功能不仅降解化合物以获得碳源,而且还解毒外源化合物以及合成具生物学活性的化合物如甾醇、前列腺素(prostaglandins)和花生四烯酸酯(arachidonate)代谢物。由于底物结构通常是疏水化合物,而产物的水溶性更高,因此 P450 可用于处理环境有毒物质,如多环芳烃和碳氟化合物(fluorocarbons)。P450 也被用于基因治疗以补偿重要代谢途径缺损,如补偿 CYP21 或 CYP17 这些在甾醇发生中起重要作用的蛋白。另外,P450 可被用于使立体和位置选择性的化合物加单氧化作用以产生重要的生物活性,如将花生四烯酸转化为 14,15-EET,这一活性在调节  $K^+$ 、 $Ca^{2+}$  注入肾中起重要作用(Graham and Peterson, 1999)。

P450 既然有如此多样的功能作用,体现出其生物学的重要性,同时可以预见 P450 的应用具有广阔的前景。通过调控其表达和活性,可望改变生物体内物质的代谢途径,改变产物的性质或数量。随着现代生物技术如基因工程技术的发展,人们可以操纵 P450 基因的结构及其表达过程,由此改变 P450 的活性,甚至构建具有天然 P450 不具备的新活性。

细胞色素 P450 在不同生物中广泛分布,从原始的细菌到高度发达的哺乳类,以加单氧酶系的氧活化成分参与多种多样的代谢反应(Estabrook, 1996)。细胞色素 P450 存在结构的多样性,这是 P450 基因长期进化的结果。正是因为结构的多样性,赋予了不同的 P450 同工酶不同的底物特异性、不同的催化机制和不同的反应活性,而使生物对多样的物质具有代谢能力。P450 分布的策略性、催化机制和基因表达调控机制的多样性对生物体来说,在整个生命活动中都是十分重要的(图 1.2)。

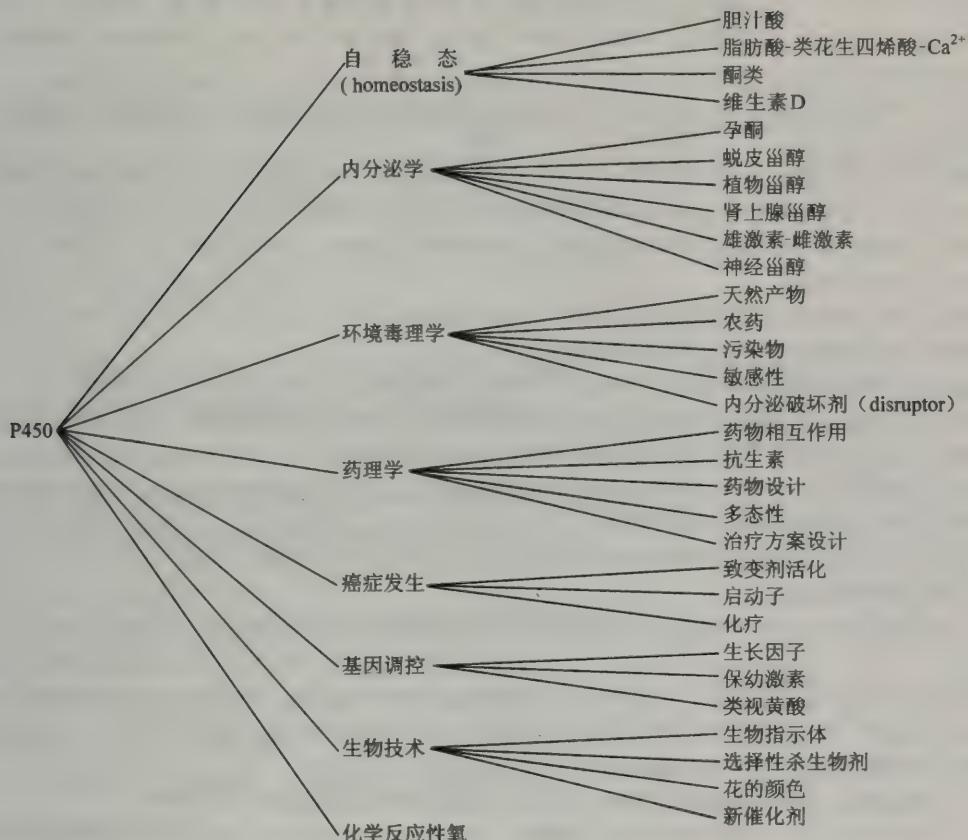


图 1.2 P450 参与的生物学过程(Stegeman and Livingstone, 1998)

### 参 考 文 献

冷欣夫. 1996. 杀虫药剂分子毒理学. 冷欣夫、唐振华、王荫长主编. 杀虫药剂分子毒理学及昆虫的抗药性. 北京: 中国农业出版社

唐振华. 1990a. 昆虫中的细胞色素 P450 及其特征. 昆虫知识, 27(1): 52~55

唐振华. 1990b. 细胞色素 P450 在昆虫适应性和抗药性中的作用. 昆虫知识, 27: 175~178

唐振华, 胡刚. 1993. 细胞色素 P450 基因的命名及其基因表达的调控. 昆虫知识, 30(5): 311~314

黄俊勇, 冷欣夫. 1991. 细胞色素 P450 酶系的研究进展. 昆虫知识, 28(5): 308~312

邱星辉, 冷欣夫. 2000. 棉铃虫幼虫加单氧酶活性的组织分布. 生态学报, 20(2): 299~303

Appleby C A. 1967. A soluble haemoprotein P450 from nitrogen-fixing *Rhizobium* bacteroids. Biochim Biophys Acta, 147:

Coon M J, Ding X, Pernecky S J *et al.* 1992. Cytochrome P450: Progress and predictions. *FASEBJ*, 6:669~673

Coon M J, Vaz A D, Bestervelt L L. 1996. Cytochrome P450 2: Peroxidative reactions of diversozymes. *FASEB J*, 10: 428~434

Estabrook R W. 1996. The remarkable P450s: A historical overview of the versatile heme protein catalysts. *FASEB J*, 10: 202~204

Fujii-Kuriyama Y, Mizukami Y, Kawajiri, *et al.* 1982. Primary structure of a cytochrome P450: coding nucleotide sequence of phenobarbital inducible cytochrome P450 cDNA from rat liver. *Proceeding of the National Academy of Science USA*. 79:2793~2797

Graham-Lorence S, Peterson J A. 1996. Cytochrome P450 1: structural similarities and functional differences. *FASEB J*, 10:206~214.

Graham S E, Peterson J A. 1999. How similar are P450 and what can their differences teach us? *Arch. Biochem. Biophysics*. 369:24~29

Guengerich E P. 1993. Metabolic reactions: Types of reactions of cytochrome P450 enzymes. In: J. B. Schenkman and H. Greim (eds) *Cytochrome P450*, Springer-Verlag, 90~103

Hayashi O, Katagiri M, Rothberg S. 1955. Mechanism of the pyrocatechae reaction. *Journal of the American Chemical Society*. 77:5450~5451

Hodgson E. 1985. Microsomal monooxygenase. In: Kurkut G A, Gilbert L I (eds), *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology* 11, Oxford: Pergamon, 225~321

Klingenberg M. 1958. Pigments of rat liver miroosomes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 75:376~386

Lindberg R L P, Negishi M. 1989. Alteration of the substrate specificity of mouse cytochrome P450 cohythemutatiom of a single amino acid residue. *Nature (London)*, 339: 632~634

Mason H S, Fowlks W L, Peterson E. 1955. Oxygen transfer and electron transport by the phnolase complex. *Journal of the American Chemical Society*. 77:2914~2915

Negishi M *et al.* 1996. Cytochrome P450 4: Structural flexibility and functional versatility of mammalian P450 enzymes. *FASEB J*, 10:683~689

Nelson D R. 1999. Cytochrome P450 and the individuality of Species. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 369(1):1~10

Nelson D R, Kamataki T, Waxman D J *et al.* 1993. The P450 superfamily: Update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes and nomenclature. *DNA Cell Biology*. 12(1):1~51

Omura T, Ishimura Y, Fujii k Y. 1993. *Cytochrome P450*. Kodansha. VCH Tokyo

Omura T. 1999. Forty Years of Cytochrome P450. *Biochem. Biophys Res Commun*, 263(3):690~698

Porter T D, Coon M J. 1991. Cytochrome P450: Multiplicity of isoforms, substrates, and catalytic and regulatory mechanisms. *J. Biol. Chem*, 266,(21):13459~13472

Poulos T L, Finzel B C, Gunsalus I C *et al.* 1985. The 2.6A crystal structure of *Pseudomonas* pulled cytochrome P450, *J. Biol. Chem*, 260:16122~16130

Stegeman J J, Livingstone D R. 1998. Forms and functions of cytochrome P450. *Comp Biochem Physiol Part C*, 121:1~3

## 第二章 细胞色素 P450 酶系组成及其循环催化机制

### 2.1 细胞色素 P450 酶系组成与 P450 的分子特征

细胞色素 P450 是一个酶系,作为功能单位,该酶系由多种组分组成。目前已知,细胞色素 P450 酶系的主要组分包括两种细胞色素(细胞色素 P450 和细胞色素  $b_5$ )、两种黄素蛋白(即 NADPH-细胞色素 P450 还原酶和 NADH-细胞色素  $b_5$  还原酶)以及磷脂等,其中细胞色素 P450 和细胞色素 P450 还原酶最为重要。

#### 2.1.1 细胞色素 P450

细胞色素 P450 蛋白是 P450 酶系的末端氧化酶,决定底物和产物的特异性,是酶系的关键组分。Maenesh 和 Anders(1973)以还原降解方法证明了 P450 含血红素分子。这些还原降解产物及其衍生物经气相色谱和质谱测定确认为高铁血红素 IX(图 2.1)。

Gunsalus 等(1974)以纯化的 P450 经酸-丙酮处理得到血红素,由其吡啶-血色原光谱和纯的、分离的样品共色谱法鉴定出细菌的 P450 辅基也是高血红素 IX。而且,将等克分子的血红素加到脱辅基色素中,随后用胱氨酸-甘油处理,尚能恢复 P450 的光谱和催化活性。

随着有关研究的进展,从假单胞菌(*Pseudomonas putida*)分离的细胞色素 P450cam 是首例用蛋白序列分析描述细胞色素 P450 的全一级结构。最近因分子生物学技术的迅速发展,通过对 cDNA 序列的测定可以推测膜结合 P450 蛋白的全氨基酸序列(图 2.2),至今除对水溶性 P450 的蛋白有所了解外,其他存在于各生物类型的很多真核细胞的细胞色素 P450 的全一级序列也得到阐明。已报道的 P450 序列超过 1000 个(其中部分为片段)。由已知的细胞色素 P450 序列对比分析结果表明,在不同 P450 的氨基酸序列中,有同源区存在。序列分析与 P450cam 的结晶结构最近的结果提供的证据表明,在同源区内的胱氨酸残基是血红素铁的轴配体(axial ligand)。保守区的苏氨酸残基在形成氧结合部位中起着关键作用。

在原子水平上研究 P450 结构始于 1985 年,以第一篇 P450 结构(P450cam, CYP101)的发表为标志(Poulos 等, 1985)。Poulos 等(1985, 1987)测定晶体 P450cam 的三维结构的分辨率为 1.63 $\text{\AA}$ 。三维结构(图 2.3)。上述结构包括许多螺旋细裂片和反向平行的  $\beta$ -折叠(sheet)结构。大部分螺旋位于分子的右半部,多数反向平行的  $\beta$ -折叠在左半部。13

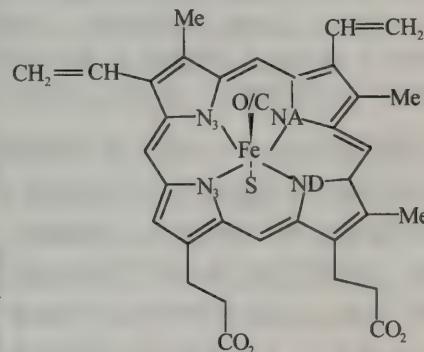


图 2.1 细胞色素 P450 晶体结构中血红素的几何构型

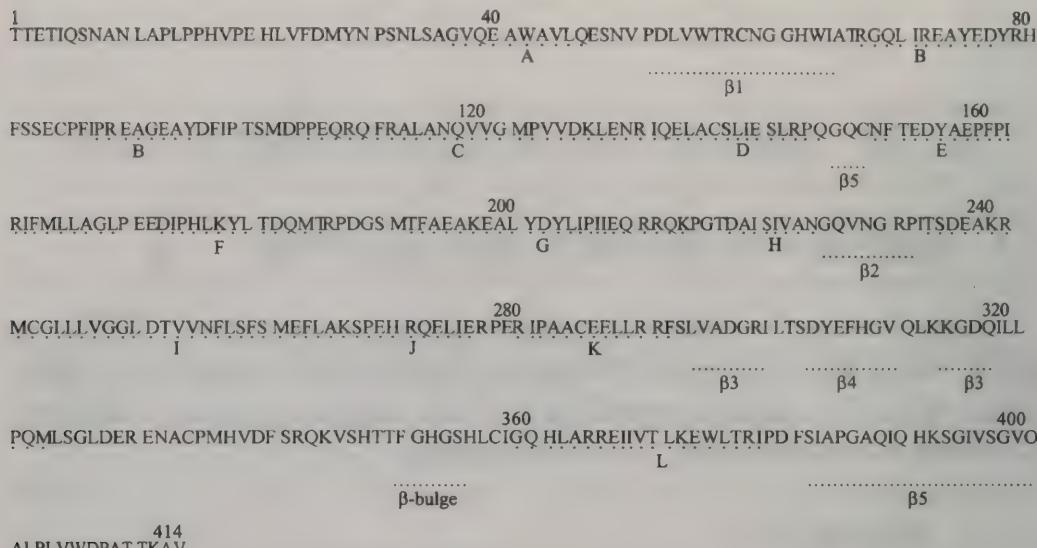


图 2.2 由 P450cam 基因的核苷酸序列推导的 P450cam 的全氨基酸序列。A, 丙氨酸; C, 脯氨酸; D, 天冬氨酸; E, 谷氨酸; F, 苯丙氨酸; G, 甘氨酸; H, 组氨酸; I, 异亮氨酸; K, 赖氨酸; M, 蛋氨酸; N, 天冬酰胺; P, 脯氨酸; Q, 谷氨酰胺; R, 精氨酸; S, 丝氨酸; T, 苏氨酸; V, 缬氨酸; W, 色氨酸; Y 酪氨酸。画线的序列表示残基含  $\alpha$ -螺旋和  $\beta$ -折叠片结构。(Makino 和 Shimada, 1993)

个螺旋体(字母 A~L)在二级结构中占优势, 并且包括总氨基酸残基的 50%。约 20% 的总残基构成 5 个反向平行的  $\beta$ -折叠。长的螺旋 I 和 L 几乎相互平行, 然而 E、F、G 和 I 构成一种反向平行的螺旋束。螺旋体 D 和 L 也是平行的。阴区的苯丙氨酸 350 和亮氨酸 356 之间的序列组成一个反向平行的  $\beta$ -膨胀体。这一区域包括靠近亮氨酸 356 背面的两个残基, 其为胱氨酸配体环, 它含有中轴硫醇基血红素配体, 即半胱氨酸 357。在其他 P450 酶系中, 半胱氨酸 357 的周围是高保守区。氨基酸残基 186~192 和 215~218 是些不规则表面环, 其中前者与 G 和 H 螺旋体连接, 而后者与 F 和 G 螺旋体相连。这些环由氢键和盐桥固定。在残基 337 和 347 之间可见相似的不规则表面环。

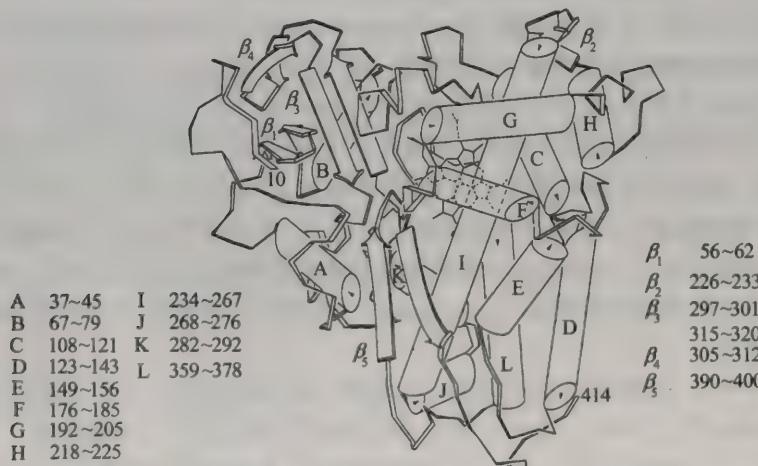


图 2.3 细胞色素 P450cam 晶体结构 [Makino and Shimada(1993)]

几年后,另一晶体结构 P450<sub>BMP</sub>(CYP102)(Ravichandran *et al.*, 1993)也已发表,它为细菌 P450<sub>BM-3</sub>的血红素结构域(BMP)。由这些结构,建立了类型 I(class I)和类型 II(class II)P450 的模型。类型 I 的 P450 需要氧化还原蛋白(redoxin)和含 FAD 的依赖 NADPH 的氧化还原蛋白还原酶;类型 II 为仅需 FAD/FMN 的 NADPH-P450 还原酶。随后,其他一些结构也被阐明,即属于类型 I 的 P450terp(CYP108)(Hasemann *et al.*, 1994)及 P450eryF(CYP197A1)(Cupp-Vickery and Poulos, 1995)。一个属于类型 IV-P450nor(CYP55A1)(Park *et al.*, 1997)直接从还原态的嘧啶(pyridine)核苷酸获得电子,而无需电子载体的介入。另一个为 P450scc(CYP105A3)(Palma *et al.*, 1994),它催化 pravastatin 生物合成的最后一步(Serizawa and Matsuoka, 1991)。P450cam 和 P450<sub>BMP</sub>处于不同状态(如有无底物)以及 P450cam 的突变型的晶体结构也已发表(Poulos *et al.*, 1986; Poulos *et al.*, 1987; Li and Poulos, 1997; Raag *et al.*, 1991; Vidakovic *et al.*, 1998)。

在整个 P450 基因超家族中,即使 P450 氨基酸序列相同性低于 20%,仅有 3 个氨基酸完全保守,但在这些结构已知的 P450,其分子结构存在一个保守的结构折叠(structural fold)。对于所有已测定的结构,P450 的结构折叠相同,但它们仍表现出一级、二级和三级结构的多样性以容纳特定的底物和氧化还原搭档(partners)以及决定蛋白的细胞定位(如可溶性的还是膜结合的,是线粒体的还是微粒体的)。

### 2.1.1.1 P450 的结构折叠

通常 P450 有 4 个  $\beta$ -折叠,大约 13 个  $\alpha$ -螺旋,其中  $\beta$ 5 是可变的。P450 保守的结构核心由螺旋束 D、E、I、L 及螺旋 J、K 组成。螺旋 I 包含高度保守的苏氨酸。N-端有酸性残基,位于活性中心吡咯环 B 的上方。螺旋 K 含完全保守的 E-X-X-R,可能参与稳定核心结构,位于血红素近侧(即假定的氧化还原搭档结合侧)。螺旋 L 构成血红素结合区的一个部分。有两套结构保守的  $\beta$ -折叠,一为  $\beta$ -折叠 1,包含 5 个股(strands);另一为  $\beta$ -折叠 2,包括 2 个股;这些折叠有助于形成疏水性的底物进入通道。

所有 P450 具有结构保守的共有序列(consensus sequence),位于血红素的近表面(proximal face)包含完全保守的半胱氨酸(Cys),它是血红素铁的第 5 个配体,也是 CO-结合蛋白在 450nm 有特征 Soret 吸收的原因。

线粒体与微粒体 P450 的明显差异在于 L-螺旋的起点,鉴定的线粒体 P450 包含 2 个正电荷氨基酸残基,通常为精氨酸(Peterson and Graham, 1998)。

在蛋白质的近表面还有一卷曲称为曲(meander),其结构高度保守,以前称为芳香区(aromatic region)(Ozols *et al.*, 1985)。

因此,变异较大的结构元件是螺旋 A、B、B'、F、G、H、K'、 $\beta$ -折叠 3 和 4 以及环(loop)。这些可变区包含与底物特异性有关的部分。

### 2.1.1.2 底物结合与识别

以上提到的非保守区或可变区通常与底物结合部位和氧化还原搭配(Peterson)结合部位相连。比较 CYP2 家族和 P450cam 的序列,Gohoh(1992)鉴定出参与底物识别的区域,以底物识别部位(substrate recognition sites, SRS)加数字命名。与底物结合相连的可变区是螺旋 A, B, B', F 和 G 以及它们毗邻的环。环 B-B' 和 B'-C 形成活性中心 1

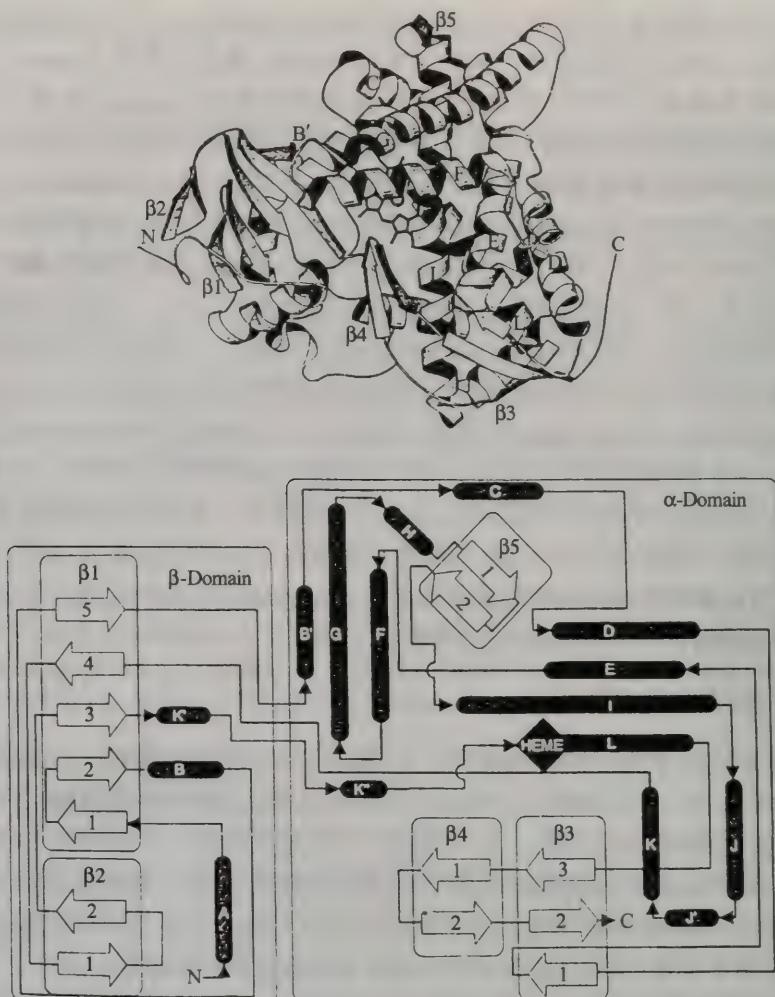


图 2.4 P450<sub>BM3</sub>二级结构元件的拓扑图。 $\alpha$ -螺旋用灰色框表示， $\beta$ -折叠的各股用灰箭头表示，卷曲和环用与以上结构元件间连结的线表示。(Graham and Peterson, 1999)

(SRS-1)，螺旋 F 和 G 及它们的环形成活性中心的“进入通道”和顶(ceiling)(SRS-2 和 SRS-3)。 $\beta$ -折叠 4 末端的  $\beta$ -转角( $\beta$ -turn)伸入活性中心(SRS-6)， $\beta$ -股(1-4)的 N-末端区(SRS-5)也伸入活性中心。另一个与底物结合相连、在反应机制中重要的区域是保守的、螺旋 I 的中心部分(SRS-4)。以上区域的大多数实际在 P450 酶的血红素/活性中心，参与底物在囊中的定向。螺旋 A、F-G 环和  $\beta$ -股 1-1 和 1-2 似乎参与底物识别。在 P450<sub>BM3</sub>位于“进入通道”入口处的  $\beta$ -股 1-1 和 1-2 的  $\beta$ -转角上的精氨酸 47(R47)突变研究发现，该位点如为酸性残基则完全抑制与花生四烯酸的结合，而如突变为丙氨酸，则降低底物结合达 5 倍。R47 突变可使产物的形成也发生变化，野生型 P450<sub>BM3</sub>产生 80% 的 18-羟基二十碳三烯酸(18-HETE)，R47A 突变体只有 66% HETE，而 14,15-环氧二十碳三烯酸(14,15-EET)则由野生的 20% 变为 R47A 突变体的 30%。但如在活性中心发生 F87V 突变(B'-C 环)，14,15-EET 的产量由野生型的 20% 变为突变体的

100%。Oliver 等 (1997) 发现精氨酸 47 突变为谷氨酸可以产生烷基三甲基铵 (alkyltrimethylammonium) 羟化活性。

有假说提出,真核生物微粒体膜结合的 P450,由于它们的疏水性增加 (Graham-Lorence *et al.*, 1995),其 F-G 环和  $\beta$ -折叠 1 和 2 的某些部分可以与膜很好地结合,可能通过膜来提高底物进入的能力。另外,底物进入通道入口可能产生明显运动,这已从对 P450<sub>BMP</sub> (Paulsen and Ornstein *et al.*, 1995; Arnold and Ornstein, 1997) 和 P450cam (Graham and Peterson, 1999) 的分子动力学模拟以及含二价铁的底物结合型 BMP(其脂肪酸的  $\omega$ -末端已移至与催化反应相一致的位置)的 NMR 光谱测定结果 (Modi *et al.*, 1996) 得到证实。这些结果以及有关 P450eryF 的报道 (Li and Poulos, 1996) 代表了真核 P450 与底物相互作用的方式,即底物结合部位可能是弹性的,可以调整它的形状以容纳其底物。

### 2.1.1.3 氧化还原搭档结合

许多年以前,人们注意到在内质网膜上 P450 分子比 NADPH P450 还原酶分子要多 (Peterson *et al.*, 1976),这一认识及人们对 P450 种类间是异质的发现,引发了对 P450 与 P450 还原酶分子相互作用是如何调控的思考 (Backes *et al.*, 1998)。这一问题已引起人们越来越多的注意,并试图建立新的生物信息学以及探求 P450 与其还原酶相互作用的实验手段,以揭示 P450 与 NADPH-P450 还原酶之间的相互作用。

P450 在没有结合底物存在下被还原可能产生超氧化物阴离子自由基或氢过氧化物,这种“非偶联”反应可能导致组织损害,因此底物和 P450 相互作用可能导致 P450 构象的改变 (Li and Poulos, 1997),从而改变 P450 结合还原酶的能力。Peterson and Graham (1998) 用“进化追踪”(evolutionary trace)方法研究了 P450 与其还原酶的相互作用,指出 P450 是通过 P450 的近表面与其氧化还原搭档(即 P450 还原酶)相互作用,P450 与其还原酶的结合方式在 P450 家族间是不同的 (Lichtarge *et al.*, 1996)。

### 2.1.1.4 微粒体 P450 的结构

第一真核 P450 的结构已经被测定为 CYP450 2C5,Johnson 博士研究组为获得 P450 2C5 的晶体结构,采取去除 N-末端第 3~21 个氨基酸残基,再在 N-末端加上 4 个组氨酸标记以优化纯化过程。另外,将 2C3 的 F 融合的 C 末端尾部替换到 2C5 的匹配位置,以增加蛋白的水溶性 (von Wachenfeldt *et al.*, 1997)。CYP450 2C5 表现出与以上描述的 P450 类似的结构折叠,螺旋 I 和 L 以及血红素-结合区高度保守,P450 2C5 中对应于以上结构的可变区域也表现出可变性,特别是螺旋 F 和 G 以及从螺旋 B 至 C 的区域。在水溶性 P450,弯曲(meander)和  $\beta$ -折叠 1 和 2 通常保守,这与 P450 2C5 有所不同。另外,相对  $\alpha$ -螺旋结构域,CYP450 2C5 的  $\beta$ -折叠域处于不同的取向,导致其底物进入通道和底物结合与根据可溶性 P450 预测建立的模型具有明显不同的结构。

从以上叙述可以得出,P450 超家族尽管其序列相同性小于 20%,但却具有相似的折叠结构,其中有高度保守的核心,也有与底物识别、底物结合以及与还原酶搭档结合相联系的可变区域。这些结构的差异可以通过结构对比以及同源性模型来分析确定。底物的结合与产物的释放需要围绕在“底物进入通道”的区域产生运动。随着 P450 的结构与功能关系的进一步了解,人们可以修饰 P450 的分子结构以代谢特定类型的底物,产生需要

的有用的化合物。

### 2.1.2 细胞色素 b<sub>5</sub>

细胞色素 b<sub>5</sub> 是许多动物组织微粒体膜的另一种细胞色素,它是血红素蛋白。首次由 Sanborn 和 Williams(1950)与 Chance 等(1955)分别从蜡蚕(*cecropia silkworm*)幼虫和大鼠肝微粒体中发现的。细胞色素 b<sub>5</sub> 是亲水-脂蛋白,分子质量为 16kDa,由两种蛋白组成,一为与生物膜相互作用的疏水性蛋白,另一为含氧化还原活性的血红素分子的亲水性蛋白,这两种蛋白以约 15 个氨基酸残基相连。氧化型的血红素蛋白的最大波长为 413nm,还原型细胞色素的最大波长为 423、526 和 557nm。后来 Spatz 和 Strittmatter (1971)用去垢剂从兔肝微粒体分离得到细胞色素 b<sub>5</sub>,分子质量也为 16kDa。

两种微粒体黄素蛋白即 NADH-细胞色素 b<sub>5</sub> 还原酶和 NADPH 细胞色素 P450 还原酶(详见下节)都能还原细胞色素 b<sub>5</sub>,也即 NADH 或 NADPH 都能作为细胞色素 b<sub>5</sub> 电子转移反应中的电子供体。Hildebrandt 和 Estabrook(1971)已证明细胞色素 b<sub>5</sub> 参与细胞色素 P450 的电子转移并提出 P450 还原反应的第 1 个电子是 NADPH-细胞色素 P450 还原酶提供的,而第 2 个电子转移到氧化的 P450 是细胞色素 b<sub>5</sub> 供给的。

### 2.1.3 NADPH-细胞色素 P450 还原酶

已知细胞色素 P450 催化单氧酶反应时,需要输入两个电子:在哺乳动物中,这两个电子来自 NADPH;从 *P. putida* 分离的可溶性 P450,是以 NADH 作为外源电子;两种不同类型的电子转移链(图 2.5)。

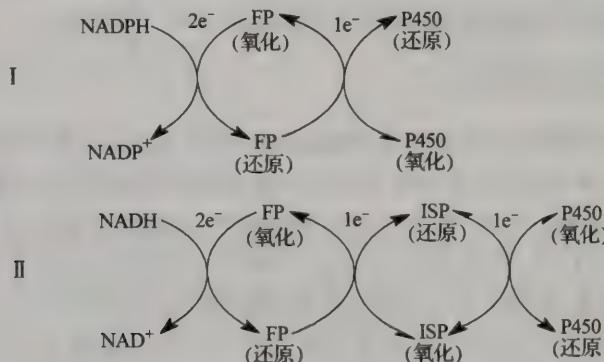


图 2.5 电子转移途径(Peterson, 1986)。FP(黄素蛋白 flavoprotein); ISP(铁硫蛋白 iron-sulfur protein)。

类型 I 是嵌进真核细胞的内质网膜上,类型 II 存在线粒体和细菌中。类型 I 中电子转移链是由含 FAD 和 FMN 作为辅基的复合黄素蛋白组成。FAD 从 NADH 获得电子,将 FMN 还原,还原型的 FMN 将电子转移给 P450,于是将 P450 还原。类型 II 系统中,还原的吡啶核苷酸先还原还原酶的 FAD,然后转移一个电子给 2Fe,2S 铁硫蛋白,铁硫蛋白“穿梭”于还原酶与 P450 之间。

#### 2.1.4 NADH-细胞色素 b<sub>5</sub>还原酶

NADH 细胞色素  $b_5$  还原酶是亲水-脂、膜束缚的黄素蛋白, 是含 1 个分子 FAD 的单聚肽。酶分子有 1 个大的亲水催化区域结构和 1 个小的含 36 个氨基酸的疏水性的膜结合区域结构。用 Triton N-101 增溶, 从聚乙二醇溶液中结晶得到的全猪肝酶(35kDa)含有疏水性的膜结合区域结构, 并得到亲水性的催化区域结构的结晶(Miki *et al.*, 1987)。Ozols and Korza 等 (1985) 已测定小牛肝微粒体 NADH-细胞色素  $b_5$  还原酶的全氨基酸序列(图 2.6)。

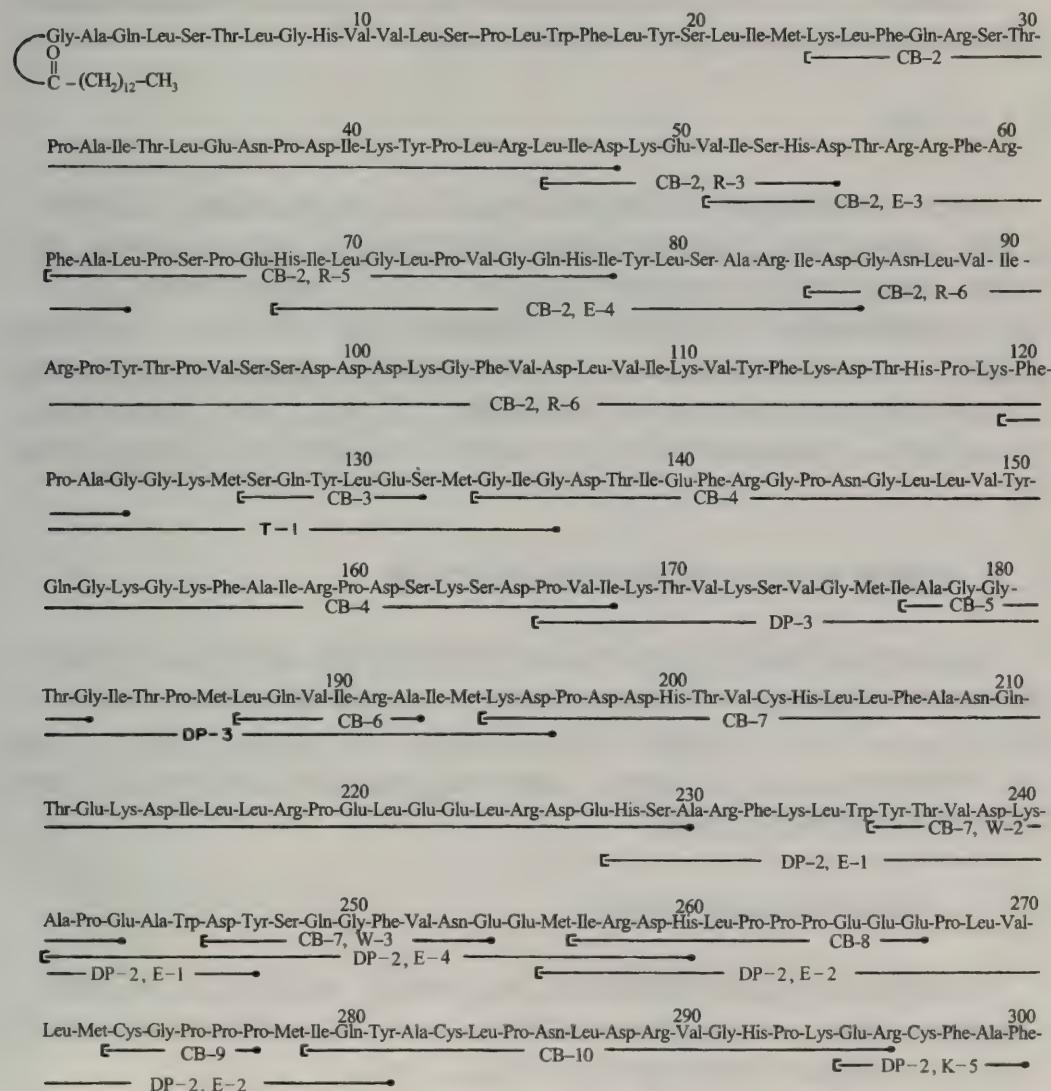
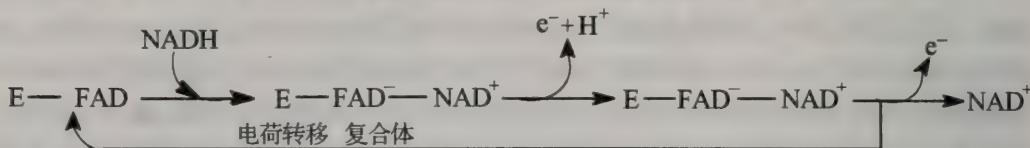


图 2.6 细胞色素 b<sub>5</sub>还原酶的全氨基酸序列图。CB(以 CNBr 裂解产生的肽), DP(ASP-Pro 位), W(色氨酸残基), R(琥珀酰化肽, 由膜裂解), E(S. *Aureus* V8 蛋白酶裂解), K(内蛋白酶 Lys-C 裂解), 图内黑线表示残基的鉴定是以 Edman 降解法。

NADH-细胞色素 b<sub>5</sub> 还原酶从 NADH 上接收两个电子,先将 1 个电子转移到细胞色素 b<sub>5</sub>,再转入脂酰去饱和酶参与脂肪酸去饱和反应,或传递到内质网的细胞色素 P450。Iyanagi 等(1984)提出从 NADH 转移电子到细胞色素 b<sub>5</sub> 的图示如下:



还原酶的 NADH 还原作用的起始是电荷转移复合体, NAD<sup>+</sup> 紧密地被还原酶束缚。这种形式的酶使细胞色素 b<sub>5</sub> 在两步中还原两个当量。

### 2.1.5 磷脂

微粒体水解酶系统的组分和线粒体的细胞色素 P450 都是整合膜蛋白,深嵌在膜内。这些蛋白的组分和催化反应的速率与专属性,将受其他膜组分性质的影响,其中最主要的是磷脂。磷脂组分约为肝细胞内质网干重的 30%~40%。它和蛋白质的摩尔比为 35:1,是由 55% 的磷脂酰胆碱 (PC) 和 20%~25% 的磷脂酰乙醇胺 (PE)、8%~10% 的磷脂酰丝氨酸、5%~10% 磷脂酰肌醇和 4%~7% 的鞘磷脂等组成。微粒体的磷脂的脂肪酸组分为 25% 的花生四烯酸和其他不饱和的脂肪酸 (Lee *et al.*, 1973)。磷脂对细胞色素 P450 和 P450 还原酶起调节作用,它可加速电子的传递而提高 P450 的氧化作用速度。

## 2.2 细胞色素 P450 酶系的循环催化机制

细胞色素 P450 酶系在自然界可能是最具有催化多样性的酶系,已从动物、植物、真菌和细菌等研究表明有多种不同的催化反应归功于细胞色素 P450 的作用 (Black *et al.*, 1987; Gonzalez 1989)。几十年来,人们对 P450 催化反应的类型已有一定的了解,对催化反应作用机制的认识也有长足的进步。但由于 P450 的结构与性质的多样性,有些 P450 催化作用的机制还不能完全确定。

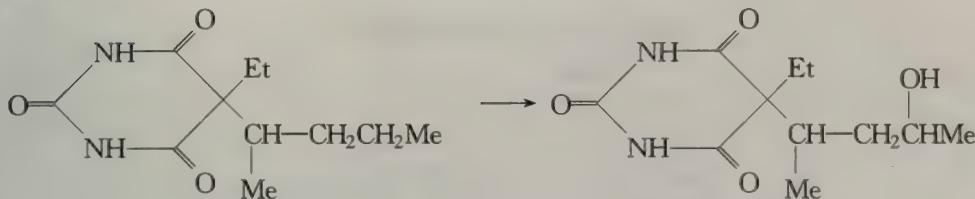
### 2.2.1 P450 酶系催化的反应类型

P450 催化的主要反应有烷基的羟基化,烷基的环氧化,羟基的氧化,氨、氧、硫部位上的脱烷基化,氨部位上的羟基化和氧化,硫部位上的氧化,氧化性脱氨、脱氢和脱卤素,氧化性的 C—C 断裂以及一些还原催化反应等 (Lewis, 1996)。

#### (1) 脂族碳的羟基化作用



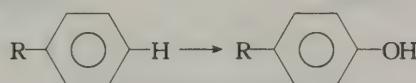
如



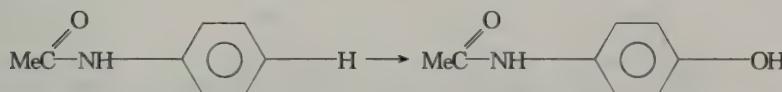
戊巴比妥

戊巴比妥-4-醇

## (2) 芳族碳的羟基化作用



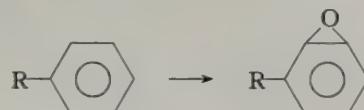
如



N-乙酰苯胺

对-羟基-N-乙酰苯胺

## (3) 芳族碳的环氧化作用



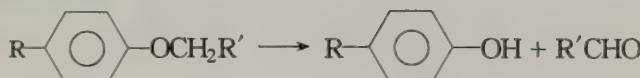
如



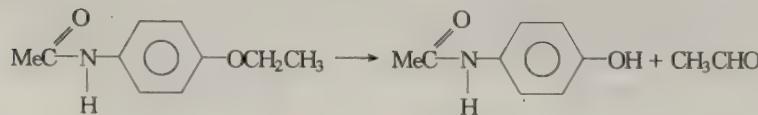
苯并芘

苯并芘-7,8-环氧物

## (4) O-脱烷基化作用



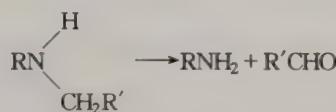
如



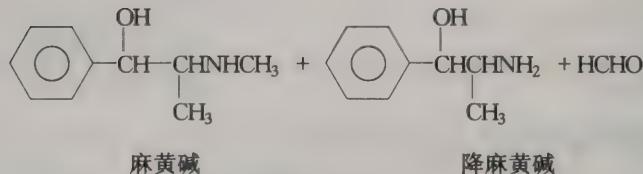
非那西汀

4-乙酰氨基酚

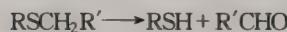
## (5) N-脱烷基化作用



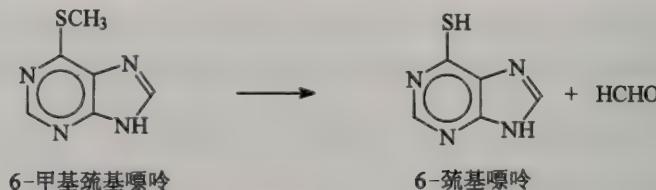
如



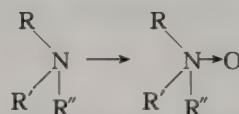
## (6) S-脱烷基化作用



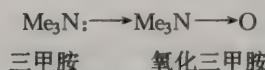
如



## (7) N-氧化作用



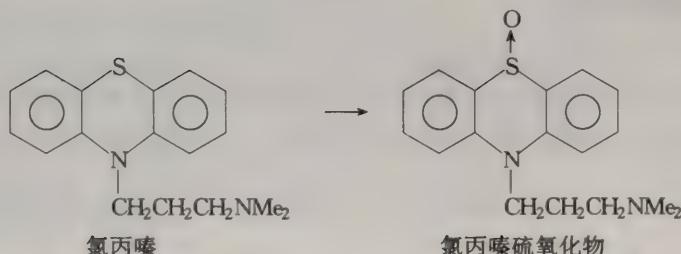
如



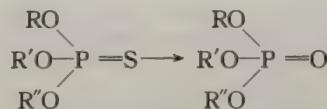
## (8) S-氧化作用



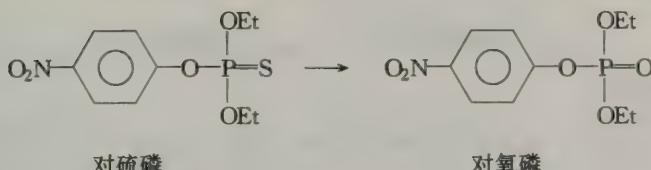
如



## (9) 脱硫化作用



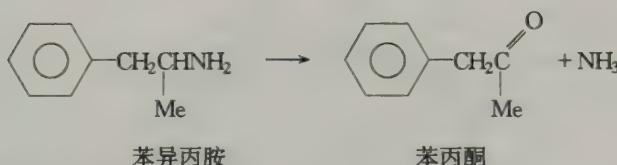
如



## (10) 脱胺基作用



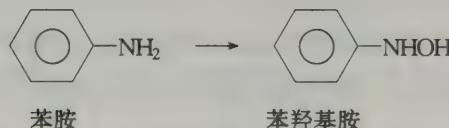
如



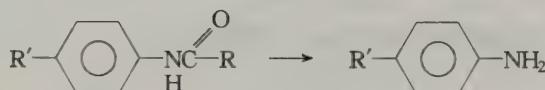
## (11) 芳胺的羟基化作用



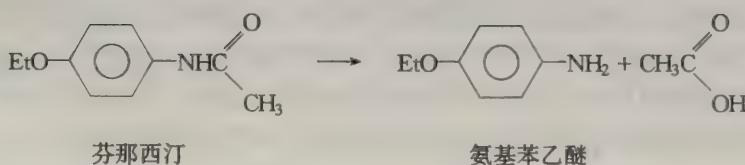
如



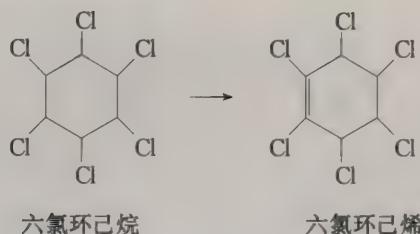
## (12) 芳胺的水解作用



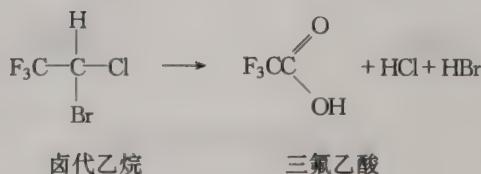
如



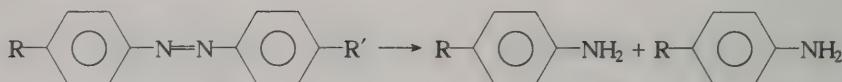
## (13) 脱氢作用



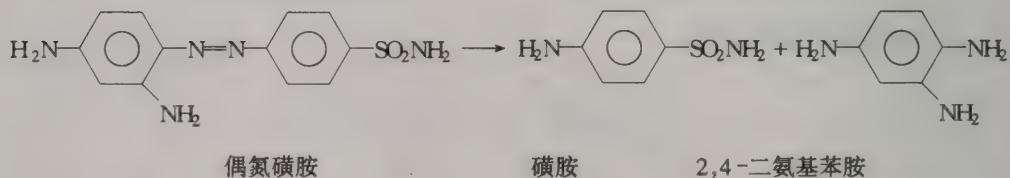
## (14) 脱卤素作用



## (15) 偶氮还原作用



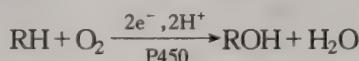
如



以上列举的这些催化反应过程是通过电子传递系统,从 NAD(P)H 转移到微粒体系统中的 NADPH-细胞色素 P450 还原酶,或铁氧还蛋白还原酶和线粒体、细菌体系中的非血红素铁蛋白,然后到细胞色素 P450;这样使得分子氧( $O_2$ )还原活化,随后一个氧原子插入底物。

## 2.2.2 P450 酶系的催化循环机制

细胞色素 P450 与底物的总反应可以以下式表示:



RH 代表底物,在催化反应过程中分子氧( $O_2$ )裂解形成水和羟基化的代谢产物(ROH)。反应中需要两个电子和两个质子。在线粒体和许多细菌中,电子是从 NADH 或 NADPH 通过依赖 FAD 的还原酶来传递到铁-硫铁氧还蛋白。然而,在微粒体内质网系统中,NADPH 传递电子是通过含黄素蛋白的 FAD 和 FMN,即细胞色素 P450 氧化还原酶,无需  $Fe_2S_2$  氧还蛋白的中介作用,而  $b_5$  也可能是提供第二个电子的来源(Backes,

1993)。有关各种 P450 系统的电子传递途径(Takemori *et al.*, 1993)(图 2.7)。

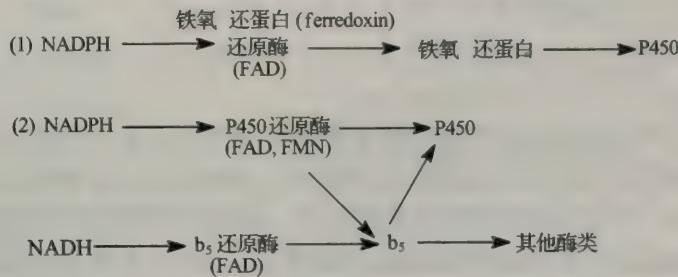


图 2.7 (1)为线粒体的电子转移系统。还原的吡啶核苷酸首先还原含 FAD 的铁氧还蛋白还原酶,再将电子传递到铁氧还蛋白。铁氧还蛋白为还原酶和 P450 之间的电子穿梭(shuttle)转移。

(2)为微粒体的电子转移系统。NADPH—P450 还原酶含 FAD 和 FMN 作为辅基,其中 FAD 为从 NADPH 来源的电子受体,FMN 为还原的 FAD 和 P450 电子转移的中间体。

细胞色素 P450 酶系的循环催化反应(图 2.8)(Porter *et al.*, 1991)。

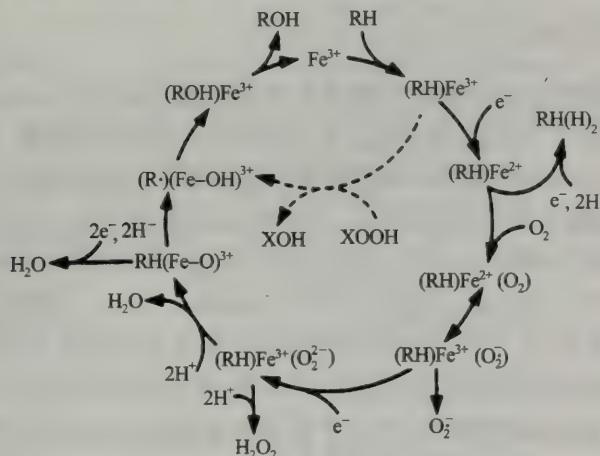


图 2.8 P450 作用机制图。Fe 表示活性部位中血红素的铁原子, RH 代表底物, RH(H)<sub>2</sub> 代表还原产物, ROH 为单氧化作用产物, XOOH 代表过氧化物作为交替的氧供体

上图为 P450 酶氧化底物的循环作用机制及一些中间步骤。当底物与 P450 酶结合后,酶上的铁原子(Fe)被还原,它是由另一个叫 NADPH—细胞色素 P450 还原酶的电子供体分子上得到一个电子( $e^-$ ),使得 Fe 由三价铁还原成二价铁,还原的铁原子便与分子氧( $O_2$ )结合。另一个电子和质子( $H^+$ )加到铁原子上形成了底物( $RH$ ) $Fe^{3+}(O_2^-)$ 复合体。此复合体失去一分子水后生成  $RH(FeO)^{3+}$  复合体,并将其氧原子传递到底物上。被氧化的底物释出后,游离的细胞色素 P450 酶又重复循环。

### 2.2.2.1 底物与 P450 酶的结合

循环反应的第一步是底物与 P450 酶的结合。已知静态的酶主要以低自旋高铁型、水分子占据血红素袋的形式存在,可能是一个水分子与血红素的铁络合。P450 与底物结

合,亲合性强,结合迅速,并伴随光谱的变化,这表明铁自旋平衡态变为高自旋态,尤其是 I 型底物(表 2.3)。因底物的结合降低了 P450 氧化还原电位,而相对稳定的底物-结合复合体就容易还原为 Fe(Ⅱ)态,这样易于电子从黄素蛋白还原酶或铁-硫氧化还原蛋白传递。

底物与 P450 的结合也使得酶构象发生改变,促使它与氧化还原组分发生相互作用,从而引起底物诱导产生两种(或多种)二级结构( $\alpha$ -螺旋和/或  $\beta$ -折叠)。在血红蛋白中两种大约平行的  $\alpha$ -螺旋可能随底物结合而分离。还有一种可能性是底物结合诱导酶构象改变,这与 P450 的加氧机制和循环催化明显有关。这可以想象为底物与 P450 结合如同开动构象开关,当底物接近时打开或关闭活性部位。底物量多时  $P450_{BM3}$  结晶结构的活性部位多次打开,则表明可能对结合底物有显著的构象变化。会调控铁自旋态平衡,氧化还原电位以及氧的结合、活化和插入底物等(Ravichandran *et al.*, 1993)。可认为在活性部位中连接带电的或极性的束缚水分子残基易于质子传递(Gerber and Sligar, 1994)。所以底物的结合可能是引发 P450 循环催化的关键阶段。随着底物的结合后,下一步是 P450 通过结合氧化还原配体进行单个的电子还原作用。

### 2.2.2.2 第一次还原作用

在 P450 循环催化过程中,第一个电子从还原酶或铁硫蛋白(redoxin)传递是相当迅速的。这期间可分为三个阶段,即①电子从 NAD(P)H 传递到还原酶,②从还原酶到铁硫蛋白,③从铁硫蛋白到 P450 分子。在微粒体系统没有中间的铁硫蛋白,而是含 FAD 和 FMN 的还原酶直接将电子传递到 P450。在 P450cam 中,电子从 NADH 迅速地传递到假单孢氧还蛋白还原酶(>600/s, 4°C),然而,后来传递到假单孢氧还蛋白和 P450 的还原作用显著地较慢(26/s, 4°C; 30~33/s, 25°C)(Archakov *et al.*, 1990)。对比之下的微粒体 P450 的电子传递链,电子从 NADPH 传递到黄素蛋白还原酶则明显地较慢(28/s)。 $P450_{BM2}$ (CYP284)经还原酶还原,由于有结合底物,其还原速率可由 11.5/s 上升到 18/s(Lewis, 1996)。从细菌到微粒体 P450 电子传递速率降低的原因,是微粒体 P450 中有两个黄素电子传递组分即 FAD 和 FMN,而细菌的 P450 系统(P450cam)中假单孢氧还蛋白还原酶仅含有 FAD。微粒体系统中黄素间电子传递速度则相对迅速,可能由于还原酶的两个黄素环相邻非常近(约 4Å)有利于电子耦合。

氧化还原组分与 P450 结合使氧化还原电位降低表明,这种结合与电子传递之间有协同作用。就 P450cam 来说,一般认为 P450 至少有 4 个碱性残基和血红素相邻,它们与假单孢氧还蛋白上的酸性残基形成离子对的静电作用(Stayton *et al.*, 1989)。在还原酶与微粒体 P450 结合的情况下也有类似作用。Munro 等(1994)证明在微粒体 P450 和  $P450_{BM3}$ (cyp102)中,保守色氨酸残基电子由还原酶传递到血红素分子所起的作用,而且色氨酸上的吲哚氮原子与血红素上一个丙酸仅相距 3Å。在微粒体 P450 中另一个保守碱性残基是赖氨酸,类似于  $P450_{BM3}$  的赖氨酸-349(P450cam 中的赖氨酸-314),它是还原酶上酸性残基的主要接触点,也可能是假单孢氧还蛋白还原酶和 P450cam 的作用部位(Lewis, 1995)。

表 2.1 P450 酶系的 I 型底物举例

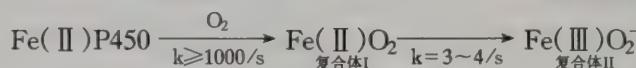
I型底物	I型底物
艾氏剂(aldrin)	2-和 4-羟基联苯(2- and 4-hydroxybiphenyls)
烯丙戊基巴比妥酸(allyl necopentyl barbituric acid)	2,2-羟基联苯(2,2-hydroxybiphenyl)
烯丙丁基巴比妥酸(allyl butyl barbituric acid)	2-羟基去甲丙咪嗪(2-hydroxydesmethylimipramine)
烷烃类(alkanes)	丙咪嗪(imipramine)
氨基比啉(aminopyrine)	异冰片基乙酸酯(isobornyl acetate)
异戊巴比妥(arnobarbital)	异-辛烷(isooctane)
d-苯异丙胺(d-amphetamine (low concentration))	三氯杀螨醇(kelthane)
异丙巴比妥(aprobarbital)	月桂酸(lauric acid)
花生四烯酸(arachidonic acid)	利多卡因盐酸盐(lidocaine (low concentration))
苯并芘(benzpyrene)	林丹(lindane)
甲基苯异丙基苄胺(benzphetamine)	亚油酸(linoleic acid)
联苯(biphenyl)	亚麻酸(linolenic acid)
正丁巴比妥(butobarbital)	马拉硫磷(malathion)
咖啡因(caffeine)	甲氧滴滴涕(methoxychlor)
樟脑(camphor)	甲氧氟烷(methoxyflurane)
四氯化碳(carbon tetrachloride)	甲基环己烷(methylcyclohexane)
鹅脱氧胆酸(chenodeoxycholic acid)	甲基苯基硫醚(methylphenyl sulphide)
氯丹(chlordane)	N-乙酰甲基硫氨酸(n-Acetyl methionine)
氯乙烷(chloroethanes)	萘(naphthalene)
氯仿(chloroform)	α-萘黄酮(α-Naphthoflavone)
p-氯汞苯甲酸(p-chloromercuribenzoic acid)	β-萘黄酮(β-Naphthoflavone)
氯丙嗪(chlorpromazine)	N-乙基马来酰亚胺(n-Ethylmaleimide)
可卡因(cocaine)	二甲基苯胺(n,n-dimethylaniline)
皮质甾醇(cortisol)	2-壬酮(2-nonanone)
环己巴比妥(cyclobarbital)	去甲苯异丙基苄胺(norbenzphetamine)
环己烷(cyclohexane)	去甲替林(nortriptyline)
1-环己烯基吡咯烷(1-cyclohexenyl pyrrolidine)	正辛烷(n-Octane)
1-环戊烯基吡咯烷(1-cyclopentyl pyrrolidine)	正辛烷硫醇(n-octane thiol)
脱氧胆酸(deoxycholic acid)	油酸(oleic acid)
去甲丙咪嗪(desmethylimipramine)	氧化震颤素(oxotremorine)
二丁基硫醚(dibutyl sulphide)	对硫磷(parathion)
滴滴涕(DDT)	戊巴比妥(pentobarbital)
狄氏剂(dieldrin)	非那西汀(phacetin)
二氢黄樟脑(dihydrosafrrole)	苯巴比妥(phenobarbital)
二苯基海因(dipenylhydantoin)	普罗勒沙(pronethalol)
α,α-联吡啶(α,α-Dipyridyl)	前列腺素(prostaglandins)
异狄氏剂(endrin)	拟除虫菊酯类(pyrethrins)
安氟醚(enflurane)	黄樟脑(safrole)
β-雌甾二醇(β-estradiol)	司可巴比妥(secobarbital)
5-乙基 5-烷基巴比妥酸盐(5-ethyl 5-alkyl barbiturates)	SKF-525A
乙基吗啡(ethyl morphine)	SKF-8742A
环氧化乙烯(fluoroxene)	牛磺去氧胆酸(taurochenodeoxycholic acid)
谷硫磷(guthion)	萜品醇(α-terpineol)
氟烷(halothane)	睾甾酮(testosterone)
庚巴比妥(heptabarbital)	四氯大麻酚(tetrahydrocannabinol)
七氯(heptachlor)	茶碱(theophylline)
2-庚酮(2-heptanone)	甲苯(toluene)
己烷(hexane)	长春巴比妥(vinbarbital)
己巴比妥(hexobarbital)	氯乙烯(vinyl chloride)
tremorine	(R)-杀鼠灵((R)-warfarin)
triton X-100	氯苯噁唑胺或拂来星(zoxazolamine)
色氨酸(tryptophan (low concentration))	
吐温-80(tween-80)	

### 2.2.2.3 氧的结合

底物结合细胞色素 P450 并发生还原作用后,第二步是分子氧迅速与高自旋 Fe(Ⅱ)P450-底物复合体结合。产生的氧化亚铁复合体相当稳定,自动氧化超氧化物的速率为 0.01/s(25℃)。有结合底物存在时,就会增加氧结合 P450 复合体的稳定性至 12~15 倍。生成的氧化 Fe(Ⅱ)P450 的 UV 差光谱为:微粒体 P450 最大吸收峰 440, 560 和 590nm, 细菌 P450cam 和线粒体 P450scc 中氧结合 Fe(Ⅱ)复合体的 UV 最大吸收峰为 418 和 555nm。

氧对还原的 P450 的高结合亲和性的决定因素之一,是自旋间相互作用的能量。它与两个自旋量子数产物呈正比(Tovrog *et al.*, 1976)。在三重基态下,分子氧有两个未成对电子,而高自旋亚铁 P450 有 4 个,所以自旋成对作用是很重要的。这可解释由低自旋到高自旋 Fe(Ⅲ)为什么会伴随着底物与 P450 的结合。Fe(Ⅱ)态对氧和 CO 亲和性强,所以对配体和血红素铁有关的其他电子因素也很重要。血红素铁在 Fe(Ⅱ)态时,是个好的 $\pi$ -供体,有利于  $S\pi$ -受体如氧、一氧化碳和氧化氮等结合。CO 与还原的 P450 结合也很迅速,其亲和速率约为氧的 1/10(Addison and Burman, 1985)。

有研究证明,细胞色素 P450 氧化亚铁复合体变为高铁超氧化物( $Fe^{3+}O_2^-$ )导致电子由铁传递到分子氧。氧化的 P450 复合体的自氧化作用生成超氧化物,在重组的微粒体系统,P450 形成了氧结合的两个不同的复合体。原三维复合体的最大 UV 吸收峰为 430 和 450nm,后来缓慢地变得更稳定,其最大吸收峰为 440nm。复合体Ⅱ的绝对光谱与氧化亚铁 P450 cam 相同,即 420 和 558nm。上述情况对氧化亚铁 P450cam 无疑是正确的,但微粒体氧化的复合体的一级反应历程是双相自动氧化,形成的是过氧化物而非超氧化物(Archakov and Bachmanova 1990)。



### 2.2.2.4 第二次还原作用

在催化反应中,进入第二个还原当量从总动力学考虑它决定反应速度步骤。此为氧化细胞色素 P450-底物复合体分解的主要途径,其速率常数 P450 cam 约为 3~4/s,而微粒体 P450 约为 1/s。Gibson and Tamburini(1984)证明,细胞色素  $b_5$  能调节第 2 个电子传递到加氧的 P450 复合体上,电子从 NADH 通过细胞色素  $b_5$  还原酶传递到细胞色素  $b_5$  的速率常数为 30/s,再从细胞色素  $b_5$  传递到 P450 为 2~7/s。电子从 NADPH 通过它的还原酶传递到细胞色素 P450 的速率常数是 1.1/s(Lewis, 1996)。

第二个电子加到氧化细胞色素 P450 复合体产生了  $Fe^{2+}O_2^-$  或  $Fe^{3+}O_2^{2-}$  ( $RH - P450 - Fe^{2+}O_2 \rightleftharpoons RH - P450 - Fe^{3+}O_2^{2-}$ )这代表还原的加氧 P450 复合体的典型结构。这种铁的过氧(或超氧)的分解能产生超氧化物。有试验证明,还原的氧细胞色素 P450 复合体分解产生过氧化氢( $H_2O_2$ ),这对底物的加氧作用是非常不利的(Archakov and Ehukov, 1989)。在无底物的情况下,还原的 P450 复合体易形成超氧化物(速率常数为 29/min)。由于还原的氧细胞色素 P450 复合体与底物结合迅速重排,而产生所要求的加

氧的底物和水,速率常数约为 30/min,底物和 P450 的来源不同,而速率常数会有很大的变化(Ruckpaul, 1984)。

### 2.2.2.5 产物的形成

加氧的还原 P450-底物复合体分解,形成总催化反应产物的过程还不甚清楚。关于铁过氧复合体的分解,形成已知产物的机制已有很多报道(Kappus, 1993; Rein *et al.*, 1993)。许多作者支持 P450 催化反应中的中间体铁(V)环氧乙烯(Fe=O)作为加氧剂,它与辣根过氧化酶(horseradish peroxidase)的催化循环中的(Fe(v)=O)相类似(图 2.9)。

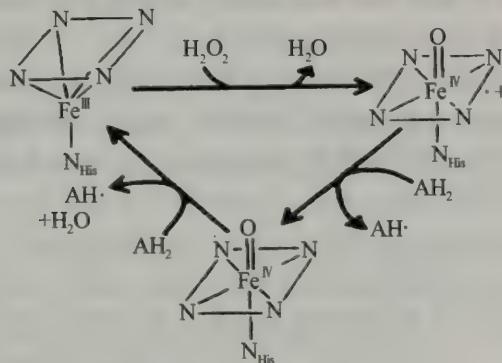
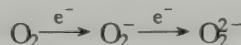


图 2.9 辣根过氧化酶的催化循环图,总电荷铁态(左上),  
化合物 I(右上)是 + I,化合物 II(下中)是中性的

从加氧 P450 在催化条件下的共振 Raman 光谱表明,有铁双氧物存在(Egawa *et al.*, 1991),双氧的活化由于连续加入两个电子而生成过氧化物如:



分子氧中的 O—O 键长为 1.21 Å 拉长到过氧化物的键长 1.49 Å。它是通过中间的超氧化物阶段,此时的键长可能在 1.26 Å 和 1.33 Å 之间(表 2.2)。在此过程中,铁卟啉系统在 P450 中表示传递电子到氧的调控方式,氧-氧键能逐渐变得脆弱,从 O<sub>2</sub> 的 497 kJ/mol 到 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 的 276 kJ/mol,再到 O<sub>2</sub><sup>2-</sup> 的 146 kJ/mol。双氧键的伸延和变弱易于裂解,裂解后一个氧原子进入底物,另一个氧原子在重排过程中得到两个质子后形成水分子,P450 又将进行下一次催化循环(Lewis, 1996)。

表 2.2 双氧物的键长、键能和 O—O 的伸展频率(Lewis, 1996)

种类	键长 / Å	键能 / kJ/mol	O—O 伸展频率 / 1/cm
O—O 双氧	1.21	497	1555
O—O 超氧化物	1.26~1.33	276	1107(1145)
O—O 过氧化物	1.49	146	850

### 2.2.3 膜对底物结合的影响

细胞色素 P450 在生物体内的重要作用之一,是将亲脂化合物转化为水溶性形式,使脂溶性化合物降解后从体内排出。肾上腺线粒体 P450scc(含胆固醇脱碳链酶活性的 P450)和肝微粒体 P4507 $\alpha$  的底物胆固醇在水溶液的溶解度很低,约为  $10^{-9}$  mol/L。肝微粒体 P450 底物实际上不溶于水,但亲脂性化合物易溶于生物膜,如胆固醇能与磷脂膜结合的克分子比例为 1:1。脂质浓度对甾类化合物底物与 P450 结合的影响研究表明, I 型差光谱值是随系统中不含 P450 的脂质体的量的增加而降低(Kominami 等, 1988)。也表明底物对细胞色素 P450 有效浓度的降低,是由于脂质浓度的增加。底物在膜上的适宜浓度决定于底物的分配系数,即  $K_p = [SL]_L / [SA]_A$ 。

SL 和 SA 表示底物分别在膜内和在水溶液中的浓度,而 L 和 A 表示在脂相和水相中,  $K_p$  为底物在液相和脂相的分配系数,  $V_A$  和  $V_L$  分别为水相和脂相的体积(升),  $V$  等于  $V_A$  和  $V_L$  之和,用以下方程式可计算出底物在水相和脂相中的浓度(图 2.10)(Parry *et al.*, 1976)。

$$[SA]_A = [S] / (K_p \times V_L / V + 1)$$

$$[SL]_L = [S] / (1 / K_p + V_L / V)$$

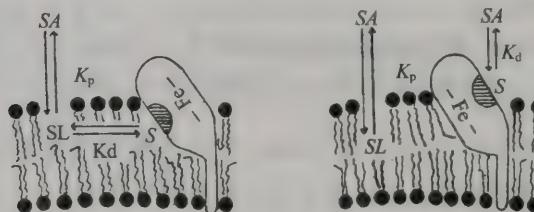


图 2.10 图示为底物与膜内细胞色素 P450 的相互作用。SA 和 SL 表示底物在水相和膜相。 $K_p$  和  $K_d$  表示底物的分配系数和解离常数。(Kominami, 1993)

在上述方程式中,底物在两相中的浓度是随脂相的体积增加而降低。这可解释为 I 型差光谱值的降低是由于脂质量的增加(Kominami, 1993)。影响底物与膜的结合也与解离常数(dissociation constant,  $K_d$ )有关(Kominami *et al.*, 1988)。Kominami 等(1986)研究了类固醇底物在肾上腺膜内与肾上腺微粒体细胞色素 P450c21(含有类固醇 21-水解酶活性的 P450)的相互作用,用停流法(stopped flow)测定了底物与 P450c21 结合和解离的动力学。用如下的模型从观察的松弛时间(relaxation time)计算其动力学参数。在这两个模型中,有两种反应即甾类化合物底物在膜内的分配和底物与 P450c21 的结合。根据实验结果推断,底物在膜内的分配反应要比底物与 P450c21 结合反应快。芳族分子在脂质体小泡之间的转移是通过水相进行,而受脂质膜释放速率的调控。底物与脂质体 P450c21 的结合和解离的动力学分析结果表明,底物面向脂相的结合部位模型较为合理(Kominami, 1986)。

Kominami 等(1988)研究了脂质的组分对类固醇与 P450 17 $\alpha$  裂合酶在磷脂酰胆碱

(phosphatidyl choline, PC) 脂质体和 PCES 脂质体内的结合常数的影响。以 PCES 模拟肾上腺微粒体磷脂的组成, PCES 脂质体含有磷脂酰胆碱 (PC), 磷脂酰乙醇胺 (phosphatidylethanolamine) 和磷脂酰丝氨酸 (phosphatidylserine), 其克分子比为 5:3:1, 依据底物面向脂相的结合部位模型, 计算类固醇 - P450<sub>17α</sub> 裂合酶复合体的解离常数。研究结果也支持细胞色素 P450 的底物结合部位面向脂相的观点。

### 2.2.4 P450 系统中蛋白质和脂类的相互作用

膜在微粒体 P450 系统中起重要作用。膜磷脂在各种氧化还原配体间的促进和调节, 以及作为底物的载体进入 P450 并接近通道和活性部位等多方面起作用。微粒体 P450 的 20~40 残基间的 N-末端片段, P450 氧化还原酶的 N-末端和细胞色素 b<sub>5</sub> 的 C-末端都被认为是跨越磷脂双分子层, 并用作固定膜内氧化还原系统的成分。P450<sub>1A1</sub> 在有或无 N-末端 30 残基的情况下, 进行的旋转扩散 (rotational diffusion) 研究, 证明了微粒体 P450 系统中蛋白-脂类的相互作用。实验用鼠肝微粒体 P450 1A1, 在没有氨基酸 - 230 (一种细胞色素 P450 的膜固定体) 的情况下, 在酵母微粒体中表达。这种截短的细胞色素有 7-乙氧基香豆素的去脱基活性。P450 1A1 的旋转扩散经 P450 - CO 复合体的诱导闪烁-吸收向异性 (flash-induced absorption anisotropy) 的测定结果表明, N-末端截短 P450 1A1 可以与酵母微粒体结合, 而且与膜连接的不仅仅是 N-末端的疏水部分, 这证明了 P450 的附加部分也参与膜结合 (Ohta *et al.*, 1994)。

膜磷脂双分子层由于底物的亲脂性而影响底物结合, 这在真核细胞和微粒体 P450 中都起重要作用。磷脂分子的性质与微粒体 P450 的血红素蛋白自旋态平衡的调控有关, 而且也可能调节 P450 与底物结合作用有关的构象变化 (Omata *et al.*, 1987)。不同的 P450 对还原酶的竞争作用决定于底物的存在 (Cawley *et al.*, 1995), 因为底物可诱导 P450 的构象改变, 并引起与氧化还原配体的相互作用。而且, 也表明由于膜磷脂、双磷脂酰甘油的结合特性促进皮质铁氧还蛋白和 P450 11A1 (CYP11A1) 间的电子传递 (Pember *et al.*, 1983)。脂质 - P450 的相互作用可能有增效性, 因为微粒体 P450 能增强磷脂横向扩散速率使底物接近膜结合的 P450 的血红素部位 (Lewis, 1996)。

磷脂的组分也影响脂质体 P450<sub>scc</sub> 的胆固醇侧链活性和胆固醇的  $K_m$  值, 但对  $V_{max}$  的影响较低。关于胆固醇结合的  $K_d$  值, 由测定胆固醇诱导的 I 型光谱变化来看它与膜上 P450<sub>scc</sub> 活性紧密相关。因此, 可认为脂质组分的作用是受胆固醇与 P450<sub>scc</sub> 结合的控制。在脂质对 P450<sub>scc</sub> 影响的研究中发现双磷脂酰甘油 (cardiolipin) 对 P450<sub>scc</sub> 有很明显的影响, 这种影响与膜的物理性质无关。但有这样的概念, 即 1 个分子的双磷脂酰甘油束缚着 1 个分子的 P450<sub>scc</sub>, 就影响胆固醇的结合。双磷脂酰甘油在膜内需要的浓度与在肾上腺线粒体内相类似, 而且双磷脂酰甘油的这种影响是发生在活细胞内的 (Kominami, 1993)。

磷脂对 P450 的影响不仅干扰底物结合, 而且还影响细胞色素 P450 与还原酶之间的作用 (Ingelman-Sunberg *et al.*, 1983; Muller-Enoch *et al.*, 1984), 甚至有时还影响反应机制。如牛肾上腺皮质线粒体的 P450<sub>11B</sub> 在无磷脂的情况下, 就不能催化醛甾酮 (aldosterone) 的形成 (Wada *et al.*, 1984; Ikushiro *et al.*, 1989)。

## 2.2.5 活性部位的氨基酸残基参与 P450 的加氧作用

在 P450 的血红素结合区有两个保守的氨基残基参与加氧作用机制(Gerber and Sligar 1994; Shimizu *et al.*, 1994)。关于 P450cam 系统的位点定向诱变试验表明, 苏氨酸-252 诱发变异为丙氨酸、缬氨酸或丝氨酸使樟脑羟基化作用降低, 伴随着增加过氧化物的形成(表 2.3)。由于苏氨酸-252 变为丙氨酸或缬氨酸, 氢键供体或受体氨基酸残基的消除, 5-羟基樟脑逐渐转换为主要产物过氧化物(Imai *et al.*, 1989)。Gerber 和 Sligar (1994) 证明, P450cam 的两种氨基酸如天冬氨酸-251 和苏氨酸-252 的位点定向诱变表明, 这两种保守的残基的共同作用有利于氧-氧键的断裂, 这可能是导致加氧产物形成机制的关键步骤, 这种作用可能对其他 P450 系统也是适用的。

表 2.3 部位一定向诱变对 P450cam 活性的影响

诱变物	5-羟基樟脑 / %	N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> / %	O <sub>2</sub> 的消耗 / 1/min
Thr-252	96	5	1330
Thr-252-s	81	15	1100
Thr-252-v	22	45	420
Thr-252-A	6	83	1100

Gerber 和 Sligar(1994)试验证明, 天冬氨酸-251 诱变为天冬酰胺使得 P450cam 的催化活性明显降低。并认为这个部位有酸性氨基酸残基存在对竞争性的加氧酶活性是重要的。然而, 对两个碱性氨基酸残基, 如精氨酸-186 和赖氨酸-178 的诱变试验表明, 它们在 P450cam 活性部位中与天冬氨酸-251 相近, 并与天冬氨酸-251 的阴离子残基发生静电相互作用。这证明了细菌酶血红素中有伸展质子交换网络(extensive proton relay network)并对双氧键的断裂起作用(Lewis, 1995a; Gerber and Sligar, 1994)。

关于 P450 $\alpha$  (CYP1A2) 假定的活性部位区进行的定点诱变试验结果表明, 谷氨酸-318 和苏氨酸-319 的重要作用。这两种氨基酸分别对应于 P450cam 的天冬氨酸-251 和苏氨酸-252(Shimizu *et al.*, 1994)。还发现这些氨基酸残基的诱变, 除了改变总催化活性外, 还会改变底物代谢作用区域的专一性(Lewis, 1996)。也有报道认为, 在 CYP1A2 中的谷氨酸-318 和苏氨酸-319, 可影响加氧物的性质和增强易于束缚过氧化物的氧-氧键断裂(Shimizu *et al.*, 1994)。

## 参 考 文 献

Addison A W, Burman S. 1985. Ligand-dependent redox chemistry of glycerin dibron chiau hemoglobin. *Biochemical et Biophysical acta*, 829: 362~368

Archakov A I, Bachmanova G I. 1990. Cytochromes P450 and active Oxygen. London: Taylor & Francis

Archakov R I, Ehukov A A. 1989. Multiple activities of cytochromes P450. *Frontiers in Biotransformation*, 1: 151~175

Arnold G E, Ornstein R L. 1997. Molecular dynamics study of time-correlated protein domain motions and molecular flexibility: cytochrome P450BM-3. *Biophys J*, 73(3): 1147~1159

Backes W L, Batie C J, Cawley G F. 1998. Interactions among P450 enzymes when combined in reconstituted systems: formation of a 2B4-1A2 complex with a high affinity for NADPH-cytochrome P450 reductase. *Biochemistry*, 37(37): 12852~12859

Backes W L. 1993. NADPH-Cytochrome P450 reductase. In: *Cytochromes P450*. Schenkman, J. B. and Griem, H. (Eds.), PP 15~34, Berlin Springer-Verlag

Black S D, Coon M J. 1987. P450 Cytochromes: Structure and Function, and Enzymol Relot Areas. *Mol, Biol*, 60:35~87

Cawley G F, Batie C J, Backes W L. 1995. Substrate-dependent competition of different P450 isozymes for limiting NADPH-cytochrome P450 reductase. *Biochemistry*, 34:1244~1247

Chance B, Williams G R. 1955. Kinetics of cytochrome  $b_5$  in rat liver microsomes, *J. Biol. Chem.* 209:945~951

Cupp-Vickery J R, Poulos T L. 1995. Structure of cytochrome P450eryF involved in erythromycin biosynthesis. *Nature Struct Biol* 2: 144~152

Egawa T, Ogorce T, Makino R. 1991. Observation of the O-O stretching Roman band for cytochrome P450cam under catalytic conditions. *J. Biol. Chem.* 266:10246~10248

Gerber N C, Sligar S G. 1994. A role for ASP-251 in cytochrome P450cam oxygen activation. *Journal of Biological Chemistry*, 269:4260~4266

Gibson G G, Tamburini P P. 1984. Cytochrome P450 spin state: inorganic biochemistry of haem iron ligation and function significance. *Xenobiotica* 14: 27~47

Gohoh O. 1992. Substrate recognition sites in cytochrome P450 family 2 (CYP2) proteins inferred from comparative analyses of amino acid and coding nucleotide sequences. *J Biol Chem.* 267(1):83~90

Gonzalez F J. 1989. The molecular biology of cytochrome P450s. *Pharmacol Rev.* 40:243~288

Graham-Lorenz S, Truan G, Peterson J A et al. 1997. An active site substitution, F87V, convert cytochrome P450<sub>BM-3</sub> into a regio- and stereoselective (14S, 15R)- arachidonic acid epoxygenase. *J. Biol. Chem.*, 1997, 272:1127~1135

Graham-Lorenz S E, Amarnah B, White R E et al. 1995. A three-dimensional model of aromatase cytochrome P450. *Protein Sci.* 1995, 4(6):1065~1080

Graham S E, Peterson J A. 1999. How similar are P450s and what can their differences teach us? *Arch. Biochem. Biophysics.* 369:24~29

Gunsalus I C, Mercks J R, Lipscomb J D et al. 1974. Bacterial mono-oxygenase-the P-450 cytochrome . In: Hayaishi O (ed), *Molecular Mechanisms of Oxygen Activation*, 556~613. New York: Academic Press

Hasemann C A, Ravichandran K G, Petersen J A et al. 1994. Crystal structure and refinement of cytochrome P450terp at 2.3 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 236: 1169~1185

Hildebrandt A, Estabrook R W. 1971. Evidence for the participation of cytochrome  $b_5$  in hepatic microsomal mixed-function oxidation reactions. *Arch Biochem Biophys.* 143(1):66~79

Ikushiro S, Kominami S, Takemori S. 1989. Adrenal cytochrome P-45011 beta-proteoliposomes catalyzing aldosterone synthesis: preparation and characterization. *Biochim Biophys Acta.* 984(1):50~56

Imai M, Shimada H, Watanabe Y et al. 1989. Uncoupling of the cytochrome P450cam monooxygenase reaction by a single mutation, threonine-252 to alanine or valine: a possible role of the hydroxy amino acid in oxygen activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 86: 7823

Ingelman-Sundberg M, Blanck J, Smetton G et al. 1983. Bioactivation or inactivation of toxic compound in drug metabolism and disposition lamble JW, (eds.), Amsterdam. Elsevier, *Eur. J. Biochem.* 134: 157~167

Iyanagi T, Watanabe S, Anan K F. 1984. One-electron oxidation-reduction properties of hepatic NADH-cytochrome  $b_5$  reductase. *Biochemistry*, 27;23(7):1418~1425

Kappus H. 1993. Metabolic reactions: role of cytochrome P450 in the formation of reactive oxygen species, In: *Cytochromes P450*. Scheinkman, J. B. and Griem, J. (eds.). Berlin: Springer-Verlag, 145~154

Kominami S. 1993. Substrate binding and the reduction of cytochrome P450. In: *Cytochrome P450*(2nd edition), Omura T (ed), 64~75

Kominami S, Higuchi A, Takemori S. 1988. In interaction of steroids with adrenal cytochrome P450 (P450(17) alpha,

lyase) in liposome membranes. *Biochemical et Biophysics Acta*, 937(1):177~183

Kominami S, Ttoh Y, Takemoto S. 1986. Studies on the interaction of steroid substrates with adrenal microsomal cytochrome P450 (P450c21) in liposome membranes. *J. Biol. Chem.* 261(5): 2077~2083

Lee T-C, Snyder F. 1973. Phospholipid metabolism in rat liver endoplasmic reticulum: structural analysis, turnover studies and enzyme activate. *Biochem Biophys. Acta* 291:71~82

Lewis DFV, Loannides C, Paske D V. 1995. A quantitative structure-activity relationship study on a series of 10 para-substituted toluene's binding to cytochrome P450 2B4 (cyp2B4) and also their hydroxylation rates. *Biochemical Pharmacology*. 50: 619~625

Lewis DFV. 1996. Cytochromes P450 Structure, Function and Mechanism. *Taylor of Francis*, 79~88

Li H, Poulos T L. 1996. Conformational dynamics in cytochrome P450-substrate interactions. *Biochimie*. 78(8-9):695~699

Li H, Poulos T L. 1997. The structure of the cytochrome P450<sub>BM-3</sub> haem domain complexed with the fatty acid substrate, palmitoleic acid. *Nat Struct Biol.* 4(2):140~146

Lichtarge O, Bourne H R, Cohen FE. 1996. An evolutionary trace method defines binding surfaces common to protein families. *J. Mol. Biol.* ,257(2):342~358

Maenesh M D, Anders M W. 1973. Characterization of the heme of cytochrome P-450 using gas chromatography-mass spectrometry. *Arch Biochem Biophys.* ,159(1):201~205

Makino R, Shimada H. 1993. Molecular properties and reaction mechanism. In: *Cytochrome P450* (2nd ed). Omura O, et al (ed), pp17~20

Miki K, Kaida S, Kasai N et al. 1987. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic study of NADH-cytochrome b<sub>5</sub> reductase from pig liver microsomes. *J Biol Chem.* ,262(24):11801~11802

Modi S, Sutcliffe M J, Primrose W U, Lian L Y, Roberts G C. 1996. The catalytic mechanism of cytochrome P450 BM3 involves a 6 Å movement of the bound substrate on reduction. *Nat Struct Biol.* ,3(5):414~417

Muller-Enoch D P, Churchill S, Fleischer et al. 1984. Interaction of liver microsomal cytochrome P450 and NADPH-cytochrome P450 reductase in the presence and absence of liquid. *J. Biol. Chem.* , 259: 8174

Munro A W, Malurkey K, Kuight J et al. 1994. The sole of trypan 97 of Cytochrome P450BM3 zoom *Bacillus megaterium* in catalytic function, *Biochemical Journal.* , 303: 423~428

Ohta Y, Sakaki T, Yabasaki Y et al. 1994. Rotation and membrane topology of genetically expressed methycolanthrene-inducible cytochrome P4501A1 lacking the N-terminal hydrophobic segment in yeast microforms. *J. Biol. Chem.* , 269: 15597~15600

Oliver C F, Modi S, Sutcliffe M J et al. 1997. A single mutation in cytochrome P450<sub>BM-3</sub> changes substrate orientation in a catalytic intermediate and the regiospecificity of hydroxylation. *Biochem.* , 36: 1567~1572

Omata Y, Aibara K, Ueno Y. 1987. Conformation between the substrate-binding site and heme of cytochrome P450 studied by excitation energy transfer, *Biochemical et Physic Acta*, 912: 115~123

Ozols J, Korza G, Heinemann F S et al. 1985. Complete amino acid sequence of steer liver microsomal NADH-cytochrome b<sub>5</sub> reductase. *J. Biol. Chem.* ,260(22):11953~11961

Palma P N, Moura I, LeGall J et al. 1994. Evidence for a ternary complex formed between flavodoxin and cytochrome c3: 1H-NMR and molecular modeling studies. *Biochemistry.* , 33(21):6394~6407

Park S Y, Shimizu H, Adachi S et al. 1997. Crystal structure of nitric oxide reductase from denitrifying fungus *Fusarium oxysporum*. *Nat Struct Biol.* ,4(10):827~832.

Parry G, Palmer D N, William D J. 1976. Ligand partitioning into membranes: Its significance in determining Km and Ks values for cytochrome P450 and other membrane bound receptors and enzymes. *FEBS letters*, 67(2): 23~29

Paulsen M D, Ornstein R L. 1995. Dramatic differences in the motions of the mouth of open and closed cytochrome P450BM-3 bymolecular dynamics simulations. *Proteins.* , 21(3):237~243

Pember S O, Powell G L, Lambeth J D. 1983. Cytochrome P450scc-phospholipid interaction, *J. Biol. Chem.* , 258:3198~3206

Peterson J A, Graham S E. 1998. A close family resemblance: the importance of structure in understanding cytochrome P450. *Structure*, 6(9):1079~1085

Peterson J A, Ebel RE, O'Keeffe D H *et al.* 1976. Temperature dependence of cytochrome P-450 reduction. A model for NADPH-cytochrome P-450 reductase:cytochrome P-450 interaction. *J Biol Chem.* 251(13):4010~4016

Porter T D, Coon M J. 1991. Cytochrome P450 multiplicity of isoforms, substrates and catalytic and regulatory mechanisms. *J. Biol. Chem.*, 266:13469~13472

Poulos T L, Finzel B C, Howard A J. 1986. Crystal structure of substrate-free *Pseudomonas putida* cytochrome P450. *Biochemistry*, 25:5314~5322

Poulos T L, Finzel B C, Howard A J. 1987. High-resolution crystal structure of cytochrome P450cam. *J. Mol. Biol.*, 192: 687~700

Poulos T L, Finzel B C, Gunsalus I C *et al.* 1985. The 2.6 Å crystal structure of *Pseudomonas putida* cytochrome P450. *J. Biol. Chem.*, 260:16122~16130

Prough R A, Imblum R L, Kouri R A. 1976. NADH-cytochrome c reductase activity in cultured human lymphocyte: similarity to the liver microsomal NADH-cytochrome b<sub>5</sub> and cytochrome b<sub>5</sub> enzyme system. *Arch Biochem, Biophys.*, 176: 119~126

Raag R, Martinis S A, Sligar SG *et al.* 1991. Crystal structure of the cytochrome P450cam active site mutant Thr 252 Ala. *Biochemistry*, 30:11420~11429

Ravichandran K G, Boddupalli S S, Hasemann C A *et al.* 1993. Crystal structure of hemoprotein domain of P450<sub>BM-3</sub>, a prototype for microsomal P450s. *Science*, 261: 731~736

Rein H, Jung C. 1993. Metabolic reactions: Mechanisms of substrate oxygenation; In: cytochromes, P450 Schenkman, J. B. and Griem, H. (eds.), Berlin: Springer-Verlag, 105~122

Sanborn R C, Williams C M. 1950. The cytochrome system in the cecropia silkworm with special reference to the properties of a new component. *J. Gen. Physiol.*, 33:579~588

Serizawa N, Matsuka T. 1991. A two component-type cytochrome P450 monooxygenase system in a prokaryote that catalyses hydroxylation of ML-236B to pravastatin, a tissue-selective inhibitor of 3-hydroxy-3-methyl glutaryl coenzyme A reductase. *Biochimica et Biophysica*, 1084:35~40

Shimizu T, Murakami Y, Hatano M. 1994. Glu 318 and Thr 319 mutation of Cytochrome P450 1A2 remarkably enhance homiletic cleavage of alkyl hydroperoxides, *J. Biol. Chem.*, 268:13296~13304

Spatz L, Strittmatter P. 1971. A form of cytochrome b<sub>5</sub> that contains an additional hydrophobic sequence of 40 amino acid residues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 68(5):1042~1046

Stayton P S, Poulos T L, Sligar S G. 1989. Putidaredoxin competitively inhibits cytochrome b<sub>5</sub>-cytochrome-P450cam association: A proposed molecular model for a cytochrome P450cam electron transfer complex. *Biochemistry*, 28:8201~8205

Takemori S, Yamazaki T, Tkushiro S. 1993. Cytochrome P450-like electron transport system in monooxygenase reaction, In: Cytochrome P450. Omura T, Tshimura Y, (eds.) Tokyo: Kodansha. 44~46

Tovrog B S, Kitko D J, Drago R S. 1976. Nature of bound O<sub>2</sub> in series of cobalt dioxygen adducts. *J. A C S*, 98: 5144~5152

Vidakovic M, Sligar S G, Li H *et al.* 1998. Understanding the role of the essential Asp251 in cytochrome P450cam using site-directed mutagenesis, crystallography, and kinetic solvent isotope effect. *Biochemistry*, 37(26):9211~9219

Von Wachenfeldt C, Richardson T H, Cosme J *et al.* 1997. Microsomal P450 2C3 is expressed as a soluble dimer in *Escherichia coli* following modification of its N-terminus. *Arch Biochem Biophys.*, 339(1):107~114

Wada A, Okamoto M, Nonaka Y *et al.* 1984. Aldosterone biosynthesis by a reconstituted cytochrome P45011 $\beta$  system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 119: 365~371

### 第三章 细胞色素 P450 的分离纯化

细胞色素 P450 是以多种类型共存在同一生物体中, P450 的多重性在研究微粒体的代谢活性、光谱特征、诱导与抑制中得到证明。Lu 和 Coon(1968)首次报道了可以从兔肝微粒体中(经苯巴比妥诱导)部分纯化 P450, 由此带来了以后 20 多年来分离、纯化工作的开展。现在已从各种生物中分离纯化了不同型的 P450。纯化的 P450 可用于制备特定 P450 的抗体, 并由这些抗体来测定某一 P450 的存在及其数量以及抑制特定的酶反应, 对 P450 的化学反应机制可以作更深刻的了解。由 P450 不同组分构成的重组体系可以用于分析 P450 催化反应的特异性, 剖析不同型 P450 的功能。另外, 微生物 P450 纯化结晶, 使我们对 P450 的分子结构有较清楚的了解, 为分析 P450 结构功能关系以及 P450 的分子设计及蛋白质工程方面奠定了基础。可见 P450 的分离纯化在整个 P450 的研究历史中具有极其重要的作用。以下就真核生物 P450 的分离纯化方法及其发展作一介绍。

#### 3.1 哺乳动物细胞色素 P450 的分离纯化

不同型 P450 的分离纯化方法决定于酶的来源, 细菌中存在的可溶性 P450 相对易于结晶纯化。存在于真核生物体中的嵌入内质网膜的 P450, 由于其疏水性趋向聚合而不易形成晶体, 分离纯化则较困难。Sato 等(1978)在论述哺乳动物肝微粒体 P450 的纯化问题指出, 细胞色素 P450 纯化时的最大困难是在细胞色素 P450 增溶时的不稳定和与微粒体膜整合蛋白的分离。因在微粒体膜上有磷脂组分, 内含有未饱和的脂肪酸, 空气能将其氧化为脂过氧化物, 在此过氧化物作用中使 P450 分解, 另外在增溶处理时也诱导使其变为 P420, 所以在增溶处理的早期, 需加保护剂如甘油或多元醇使 P450 受到保护。EDTA、二硫苏糖醇(DTT)和丁代羟基甲苯等也是 P450 有效的保护剂。

为了得到 P450 的绝对光谱而制备 P450 微粒, 必须去除微粒体血红素组分的细胞色素  $b_5$ , 发现枯草菌蛋白酶(nagarse)是最有效的去细胞色素  $b_5$  的蛋白酶又可最少使 P450 变为 P420, 甘油是抑制 P450 转变为 P420 的有效保护剂。以 Pb 处理的兔肝微粒体在甘油存在情况下, 用枯草菌蛋白酶厌氧硝化可得到 P450 微粒, 约含 5.5 nmol/mg (Nishibayashi, 1968)。

后来发现从哺乳动物肝微粒体的 P450 纯化时增溶作用是很重要的。那么何种增溶剂较好, 哪一种保护剂能在纯化时不使 P450 变性为 P420 是开展分离纯化工作之前要考虑的问题。长期的分离纯化实践, 人们已有一些成功的方法, 根据报道的情况总结如下(表 3.1)。

表 3.1 肝微粒体 P450 的纯化方法

肝微粒体 P450 来源	增溶剂	保护剂	层析柱	P450 比含量 / (nmol/mg)	文献
Pb 诱导兔肝	Lubrol-Wx	甘油	DEAE-Sephadex	0.2 (含 b <sub>5</sub> 及 P420)	Miyake <i>et al.</i> (1968)
Pb 和 Mc 诱导大鼠肝	Triton-N101	甘油	DEAE-Cellulosealuminia 凝胶-Cr	5.0 (含 NADH-高铁氯化物)	Fujita <i>et al.</i> (1973)
Pb 诱导兔肝	Emulgen-911	甘油, DTT	DEAE-Cellulose	1.0	Sato <i>et al.</i> (1973)
兔肝	脱氧胆酸盐	甘油, DTT	DEAE-Cellulose	含大量 P420	Lu and Coon (1968)
Pb 和 Mc 诱导大鼠肝	胆酸盐	甘油, DTT	硫酸铵和磷酸钙凝胶	5.0 ~ 5.5 (含 P420)	Lu and Levin (1974)
诱导大鼠肝	胆酸盐	甘油, DTT	硫酸铵和磷酸钙凝胶	2.4 (含细胞色素 b <sub>5</sub> )	Lu and Levin (1972)
鼠肝	Emulgen-911	甘油, DTT	DEAE-Cellulose-Sephadex-LH-20	9 ~ 11 (不含 b <sub>5</sub> 磷脂和 NADPH-P450-还原酶, 但含 P420)	Levin <i>et al.</i> (1974)
Pb 诱导兔肝	胆酸盐	甘油, DTT and EDTA	含 ω-氨基-n-辛基的 Sephadex - 48	9.0 (不含 P420, b <sub>5</sub> and NADPH-P450 还原酶)	Imai and Sato (1974a)
Pb 诱导兔肝	胆酸盐	甘油, DTT 丁代羟基甲苯	DEAE-Cellulose-Amberlite-XD - 2 磷酸钙凝胶	13.0 (不含 b <sub>5</sub> , 但有 NADPH-P450 还原酶存在)	Van der Hoeven and Coon (1974)
Pb 诱导兔肝	Emulgen - 913 胆酸钠	甘油, DTT and EDTA	羟基磷灰石 MC-Sephadex-c - 50	17.0	Imai and Sato (1974b)
Pb 诱导兔肝	Renex - 690	聚乙二醇	羟基磷灰石磷酸钙凝胶	17.0 (不含 P420, b <sub>5</sub> and NADPH-P450 - 还原酶)	Van der Hoeven and Coon (1974)
PB 诱导大鼠		甘油	AH-Sepharose	8.56	Funae and Imaoka (1985)
3MC 诱导大鼠		甘油	AH-Sepharose	12.7	Funae and Imaoka (1985)
Pb 诱导兔肝	Lubrol-Px 胆酸钠	甘油, EDTA	DEAE-Sephadex	17.0	葛兵, 汪静英 (1987)
PB 诱导大鼠			AO-Sepharose	14.3 ~ 15.1	Kastner and Neutbert (1992)
Pb 诱导雄大鼠肝	Lubrol-Px 胆酸钠	甘油, EDTA	DEAE-Sephadex 磷酸钙凝胶	12.0	黄俊勇, 冷欣夫 (1992)
人			蛋白酶	11.5	Isa <i>et al.</i> (1992)
猿			AO-Sepharose	9 ~ 16	Kastner and Neutbert (1992)

上表列举的由肝微粒体纯化 P450 方法中的各种条件。需要指出的是① $\omega$ -氨基-n-辛基琼脂糖 ( $\omega$ -amino-n-octylspharose) 层析柱分离 P450 的回收率可高达 90%，回收的 P450 总量的 50% 以上集中在峰范围内，比含量约为 10 nmol/mg 蛋白，而且得到的 P450 蛋白很稳定。②胆酸盐是纯化 P450 蛋白时较好的增溶剂。但其使用浓度和对蛋白质的比率，对从  $\omega$ -氨基-n-辛基琼脂糖柱分离得到高回收率极为重要。如浓度或比率太低，定量的 P450 增溶不完全而过柱时被吸附。磷酸盐的浓度则影响增溶的效果。胆酸盐和 Emulgen 913 的浓度，对从分析柱上分离 P450 与其他微粒体蛋白也极为重要 (Sato *et al.*, 1978)。

随着实验技术的发展，由哺乳动物组织纯化 P450 的方法也不断改进，Imaoka 等 (1986) 用阴离子交换 (DEAE-5PW) 和阳离子交换 (SP-5PW) 的 HPLC 方法纯化 PB 和 MC 诱导的大鼠肝微粒体中多型的 P450，Emulgen-911 和甘油分别为增溶剂和保护剂。Emulgen-911 对两种离子交换柱的适宜浓度为 0.4%。缓冲液含甘油的浓度为 20%，可从未诱导的肝微粒体中得到 7 种 P450，从来自 PB 和 MC 诱导的肝微粒体中得到 5 种。P450 的回收率和层析柱的分辨情况都较满意。

哺乳动物细胞色素 P450 层析纯化所遇到的问题：①在内质网的 P450 酶的多重性和结构的相似性，在肝微粒体共有 20 种以上不同，但又很相似的 P450 酶。②在这些大量相似的 P450 酶中，每个酶的含量很低，这对纯化也带来一定的困难。亲水-脂的膜结合细胞色素 P450 在层析纯化前，需要用表面活性剂增溶。但表面活性剂能破坏 P450 酶的结构，因此需加保护剂不使其变性。③表面活性剂不仅干扰酶纯化分析时蛋白的监测，而且它与层析柱树脂相作用，降低层析的分辨率和柱的结合性能。

膜增溶用表面活性剂是 P450 酶分离纯化时的重要步骤，因为它的回收率高，一般常用的是胆酸钠，Emulgen 和 Lubrol 表面活性剂。Lubrol-Px 是 P450 酶层析中较适宜的表面活性剂。它对微粒体细胞色素 P450 的增溶效能约为 96%，它与胆酸钠相比不干扰强阴离子交换剂。在鉴定中，Lubrol 在波长为 280nm 时无吸收，此波长可作为层析过程中的蛋白监测。两性离子表面活性剂，如 CHAPS 在效能上比其他表面活性剂低一些，但它有高富集性，适宜作为微粒体细胞色素 P450 纯化时的增溶剂。表面活性剂对微粒体膜增溶的效能见下表。

表 3.2 表面活性剂对微粒体膜增溶的效能 (Roos, 1996)

表面活性剂	(%)	产率/%		比率 P450/蛋白	大鼠 (处理情况)
		P450	蛋白		
胆 酸 钠	0.4	92	82	1.12	苯巴比妥处理
	3.0	95	92	1.03	未处理
	0.5	97	62	1.56	未处理
	0.3	71	72	0.99	未处理
	0.1	35	51	0.69	未处理
Renex-690	1.5	92	82	1.12	$\beta$ -萘黄酮处理
Emulgen-911	0.2	98	82	1.20	未处理
	0.2	85	51	1.67	未处理
Lubrol-PX	0.8	96	69	1.39	未处理
	0.4	93	59	1.58	未处理
	0.2	79	47	1.68	未处理

续表

表面活性剂	(%)	产率/%		比率 P450/蛋白	大鼠 (处理情况)
		P450	蛋白		
CHAPS	0.5	83	43	1.93	未处理
	0.3	63	20	3.10	未处理
	0.1	40	21	1.90	未处理

阳离子型表面活性剂,如溴化十六碳烷基三甲铵易使细胞色素 P450 转化为 P420, 所以不宜用作 P450 增溶。同样的理由,辛基葡萄糖苷、Tween - 20 和十二烷基二甲基丙烷磺酸酯等都不宜作增溶剂(Roos, 1996)。下表内列举一些广泛应用的表面活性剂的性质及其对层析的影响。

表 3.3 P450 层析中广泛应用的表面活性剂的性质(Roos, 1996)

性质	胆酸钠	Emulgen - 911	Lubrol-PX
对强阴离子交换剂的干扰	是	否	否
在波长 280nm 吸收	否	是	否
透析	是	否	否
对 P450 活性强抑制效应	否	是	是

分离不同的蛋白要考虑蛋白的结构特性和物理化学性质,如分子的大小、表面特征和特定结构的结合区域等。由于各 P450 酶的分子质量相近,其范围在  $(48\sim 56) \times 10^3$ Da, 因此大小排阻(size-exclusion)层析不宜采用(Ryan and Levin, 1990)。分离纯化 P450 酶有许多层析方法简列如下:

表 3.4 分离纯化 P450 的层析方法

方法	文献
低压液相层析(LPLC)	Ryan and Levin, 1990
快速蛋白液相层析法(FPLC)	Kastner and Neutbert, 1992
高效液相层析法(HPLC)	Isa <i>et al.</i> , 1992
离子交换层析法(IEC)	Ryan and Levin, 1990
磷酸钙凝胶层析法	Ryan and Levin, 1990
固定的金属亲和层析法(IMAC)	Roos, 1993
疏水的相互作用层析法(HIC)	Imai and Sato, 1974
亲和层析法:	
配体亲和层析法	Sundin <i>et al.</i> , 1987
免疫亲和层析法	Wrighton <i>et al.</i> , 1986
蛋白亲和层析法	Miyatake <i>et al.</i> , 1994
层析聚丙烯酰胺法	Blaicher and Kastner, 1993

P450 酶的选择诱导可得到更高 P450 产量。依据 P450 在大鼠肝内的表达, P450 酶可区分为三类: ①不诱导或轻微诱导的组成型表达酶(如 P450 2C7、2C11、2C12、2C13、2D1、2D2); ②外源化合物诱导显著增加构成表达酶(如 P450 1A2、2A1、2B2、2C6、2E1、3A2、4A1); ③不能组成型表达, 但可被外源化合物诱导的酶(如 P450 1A1、2B1、3A1)。对上列第一类酶进行纯化, 只能用未诱导的动物的微粒体。而经诱导剂预处理动物诱导的微粒体的 P450 含量高, 适宜于进行分离纯化, 例如用苯巴比妥处理大鼠, 则 CYP2B1 和 CYP3A 同工酶的含量显著增加。然而, 没有同工酶的专性诱导剂, 诱导剂可能在诱导几种 P450 酶的同时, 抑制其他的 P450, 如地塞米松(dexamethasone)是一种有效的 CYP3A 诱导剂, 同时它对 CYP2C11 有抑制作用。下表列举了一些主要的 P450 酶的组成型表达水平和几种外源化合物对其的诱导效应。

表 3.5 外源物对鼠肝微粒体每毫克蛋白中 P450 酶含量(pmol /mg)的影响(Roos, 1996)

P450	未处理		PB	DEX	PCN	TAO	3MC	INH	CLO	KEP
	雄鼠	雌鼠								
合计	900	820	1300	1900	1390	4390	2080	1000	1000	1935
1A1	26		22				1427			
1A2	43		44				439			
2A1	52		131				256			
2B1/2	<10	<10	750	380						
2C6	196		499				131			
		350								
2C7	93	130	83		50	110	48	38	31	270
2C11	28	n. d.	190	100			130			
2C12	<10	350	<10							
2C13	86	<1	13		100	110	26	46	34	66
2D1	110	110								
2E1	66		37		47	42	26	310	50	
3A	110	7	315	1250		3430	19			
4A1	15		10				15			

注: PB(苯巴比妥), DEX(地塞米松), PCN(孕烯酮-16 $\alpha$ -腈), TAO(三乙酰竹桃霉素), 3MC(3-甲基胆蒽), INH(异烟肼), CLO(clofibrate), KEP(Kepone)。

Ryan 和 Levin(1990)总结了有关分离 P450 酶的情况(表 3.6), 认为不同 P450 酶应用的连续层析步骤有以下几种: 即离子交换层析, 磷酸钙吸收和免疫亲和层析等。许多已发表的纯化 P450 酶的方案也基于这些方法, 只不过在应用次序上改变而已, 但其结果却对 P450 酶的分辨率有重要影响。此外, 在分离个别 P450 酶时, 如有其他细胞色素 P450 酶存在, 就会影响层析柱的效能(Kastner and Neubert, 1992; Blaicher and Kastner, 1993)。

表 3.6 细胞色素 P450 分离的连续层析步骤(Ryan and Levin, 1990)

CYP	2A1	2B1	1A1	1A2	2B2	2C7	2C13	2C11	2C12	2E1	2C6
处理	aroclor	aroclor	aroclor	异黄樟脑	aroclor	-	-	-	-	异烟肼	PB
性别	雄性♂	雄性♂	雄性♂	雄性♂	雄性♂	雄性♂	雄性♂	雄性♂	雌性♀	雄性♂	雄性♂
预分离	PEG	PEG	PEG	AS	PEG	-	-	-	-	OA-Seph	OA-Seph
Ca-PO <sub>4</sub>					+						
DEAE					+						
DE52	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
DE53	+					+	+	+	+		
DEAE					+						
HA	+	+	+		+					+	+
DEAE, 52,											+
53											
CM-Seph						+	+	+	+	+	
phosphocell										+	+
immuno				+	+	+					+
Ca-PO <sub>4</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

注: 鼠肝微粒体样品用胆酸钠增溶。PB(苯巴比妥), PEG(聚乙二醇), AS(硫酸铵), OA-琼脂糖(8-辛基氨基琼脂糖), HA(磷酸钙凝胶), DE51, 52, 53(DEAE-Cellulose DE51, DE52, DE53), CM-Seph (CM-Sepharose), immuno (免疫亲合性), phosphocell (磷酸纤维素)。

有些 P450 家族和亚家族成员的分离纯化方法未能全部列出, 这里只举出一些部分事例(表 3.7)和一些不常用的分离方法, 如从鼠鼻黏膜分离 CYP2G 应用层析聚丙烯酰胺 (Ding and Coon, 1988)。这些方法也用于分离人肝活组织为材料的 P450 (Isa *et al.*, 1992)。其中也包括非常普通的层析方法, 如金属螯合亲和层析、蛋白亲和层析和疏水相互作用层析法等。

表 3.7 细胞色素亚家族成员的层析纯化方法

P450 酶	层析顺序	文献
2D(鼠肝)	N-lauryl-aminoethyl-sepharose, CM-Sepharose, DEAE-Cellulose	Gonzalez <i>et al.</i> , 1987
2G(鼠鼻黏膜)	PEG, Polybuffer exchanger, CM-Sepharose, S-Sepharose, HA	Ding and Coon, 1988
2H(鸡肝)	Octyl-Sepharose, TSK-DEAE-Cellulose, HA.	Sinclair <i>et al.</i> , 1990
4A(鼠肝)	AO-Sepharose, HA, DEAE-Sephadex, CM-Sepharose.	Gibson <i>et al.</i> , 1982; Tamburini <i>et al.</i> , 1984
4B(鼠肝)	OA-Sepharose, DEAE-59W, HA.	Imaoka and Funae, 1990

注: AO-Sepharose (8-氨基辛基-琼脂糖)。

OA-Sepharose (n-辛基氨基-琼脂糖); HA(磷酸钙凝胶)。

Pidgeon 等(1991)首次报道了用固相人工膜 (immobilized artificial membrane, IAM) HPLC 系统来纯化功能膜蛋白 P450 和 P450 还原酶。此人工膜表面是共价结合形成的脂膜, 其膜表面上的脂分子含有极性头和两个非极性烷基链。脂的固定需要具有  $\omega$ -羧酸功能基合成的脂, 羧基使脂分子与硅微粒体表面共价结合。经用这种固相人工膜已从大鼠的肝、肾和肾上腺微粒体纯化了 P450 酶系组分。而纯化的 P450 和 P450 还原酶的功能已由差光谱、CO 结合和体外重组酶活性等鉴定得到证明。此法还用于纯化其他膜蛋白, 包括大鼠肝血浆膜 NADH 氧化酶和高铁氰化物氧化还原酶等。

### 3.2 昆虫细胞色素 P450 的分离纯化

Ray(1967)首次报道在丽蝇和家蝇体内存在 P450。此后,从昆虫中提取微粒体蛋白多是根据哺乳动物组织的提取方法。昆虫 P450 纯化研究大多数是以家蝇(Schonbrod and Terriere, 1975; Capdevila and Agosin, 1977; Capdevila *et al.*, 1975)和果蝇(*Drosophila melanogaster*)(Naquira *et al.*, 1980)开展的。其中一个主要困难是增溶时, P450 迅速变性为 P420。P450 的变性可以用甘油和其他多元醇保护(Ichikawa and Yamano, 1967)。Capdevila *et al.* (1975)在有甘油、EDTA 和 DDT 存在的情况下用 Triton X - 100 从 Fc 家蝇品系的微粒体溶解了加单氧酶组分。P450 再经交联葡聚糖 G - 200 和 DEAE-交联葡聚糖柱层析分离,由此得到两个性质不同的 P450,但其比含量较低(P450 0.8nmol/mg, P450I 0.12nmol/mg 蛋白)。

Schonbrod 和 Terriere(1975)从几个不同品系家蝇的微粒体中,在有 DTT 和甘油存在的情况下,用胆酸钠增溶,用 DEAE-cellulose 柱层析分级,发现了微粒体中存在 2 个不同的 P450 型。更详细的工作是 Capdevila 和 Agosin (1977)对 NAIDM 家蝇 P450 的鉴定,他们采用的方法是用胆酸钠增溶,然后用  $\omega$ -氨基- n-辛基琼脂糖- 4B 柱分级,再经羟基磷灰石、交联葡聚糖 G - 50、DEAE - 交联葡聚糖 A-50 和 CM - 交联葡聚糖柱层析,由此得到 3 个分子量和光谱性质不同的 P450。

Naquira 等(1980)从果蝇微粒体中分离出三种光谱特征以及重组体系催化活性不同的 P450,它们的分子质量分别为 51.750, 50.800, 54.800 kDa, 比含量分别为 3.38, 4.83, 6.85 nmol/mg。

另外,Ronis 等(1988)用 5 种柱层析部分纯化了家蝇细胞色素 P450 各组分,Sundseth 等(1989)用 3 种柱层析部分纯化了果蝇 P450,Feyereisen 等(1989)用两种柱层析纯化了家蝇 P450。

HPLC 方法因其高分辨率、高回收率、高速以及上样量少的优点,已于 20 世纪 80 年代末被用于昆虫 P450 的分离纯化,Wheelock 等(1989),Scott 和 Lee (1993)采用 HPLC 方法,同时纯化了家蝇微粒体 P450、细胞色素 b<sub>5</sub> 和细胞色素 P450 还原酶。此方法是先用聚乙二醇分级分离和用苯基 - 5PW 柱疏水互作层析(HIC)从大部分其他蛋白分离出 P450;再用 DEAE - 5SW 柱进行阴离子交换,可分出 P450、细胞色素 b<sub>5</sub> 和细胞色素 P450 还原酶,此法得到的 P450CYP6D1 的比含量为 14.4nmol/mg 蛋白,SDS - PAGE 鉴定其分子质量为 54.3kDa。离子交换的细胞色素 b<sub>5</sub> 部分用 C<sub>8</sub> 反向 HPLC 进一步纯化,b<sub>5</sub> 部分的比含量 51.8nmol/mg 蛋白,SDS - PAGE 鉴定分子质量 19.7kDa。而含细胞色素 P450 还原酶活性的部分,再用 NADP - 琼脂糖亲和层析进一步纯化,可得细胞色素 P450 还原酶,分子质量为 72kDa。

最近 Scharf 等(1998)用固相人工膜 HPLC 方法(IAM - HPLC)纯化德国小蠊(*Blattella germanica* L.)微粒体 P450。以胆酸钠 Lubrol-WX 作增溶剂,甘油和 EDTA 为保护剂层析得到的 P450 样品进一步纯化后,用银染鉴定 SDS - PAGE 凝胶蛋白带分子质量为 49kDa(Scharf *et al.*, 1998)。

### 3.3 植物细胞色素 P450 的分离纯化

动物 P450 的纯化较早就已经获得成功,但植物 P450 纯化却是 20 世纪 90 年代的事 (Bolwell *et al.*, 1994)。植物 P450 纯化的步骤基本是先差速离心制备微粒体膜,然后用非离子型去污剂增溶, Triton X-114 和胆酸钠均有较好的效果。经饱和硫酸铵沉淀后选择弱阴阳离子交换材料和凝胶材料进一步纯化, 氨基辛基琼脂糖凝胶和 MonoQ 较好。而 DEAE 似乎对酶有损害。染料亲和柱及配体亲和柱也较常用(赵剑 *et al.*, 1999)。在纯化过程中遇到的困难是 P450 的鉴定, 由于微粒体制备液中叶绿素及其他血红素蛋白如过氧化物酶和过加氧酶等的干扰, 用光谱方法(利用在  $\lambda 450\text{nm}$  处, P450 有吸收峰这一性质)测定的结果不可靠。用高盐溶液洗掉过氧化物酶, 是光谱方法的一个改进。

植物 P450 分离纯化的主要困难在于它的低含量以及在植物提取中不稳定, 因为 P450 定位于微粒体膜的胞质(cytoplasmic)表面, 且植物中蛋白酶的含量高。但出于对 P450 催化反应重要性的认识, 有以下几个 P450 已被纯化到同质。

表 3.8 从植物中纯化的细胞色素 P450

P450	来源	文献
t-CAH(肉桂酸-4-羟化酶)	菊芋( <i>Helianthus tuberosus</i> )的块茎 菜豆( <i>Phaseolus vulgaris</i> )的培养细胞	Gabriac <i>et al.</i> , 1991 Rodgers <i>et al.</i> , 1993
3,9-二羟基紫檀素(dihydroxypterocarpan)6 $\alpha$ -羟化酶	大豆( <i>Glycine max</i> )培养细胞	Kochs and Grisebach, 1989; Kochs <i>et al.</i> , 1992
毛地黄毒苷(digitoxin)12 $\beta$ -羟化酶	希腊毛地黄( <i>Digitalis lanata</i> )培养细胞	Petersen and Seitz, 1988
香叶醇/橙花醇环氧化酶	鳄梨( <i>Persea americana</i> )的中果皮	O'Keefe and Leto, 1989
P450 <sub>TYR</sub>	高粱( <i>Sorghum bicolor</i> )的幼苗	Sibbesen <i>et al.</i> , 1994
小檗宁合酶	小檗( <i>Berberis stolonifera</i> )培养细胞	Stadler and Zenk, 1993
香叶橙 10-羟化酶	长春花( <i>Catharanthus roseus</i> )培养细胞	Meijer <i>et al.</i> , 1993
7-乙氧香豆素 O-脱乙基酶	菊芋( <i>Helianthus tuberosus</i> )块茎	Batard <i>et al.</i> , 1995
AOS(丙二烯氧化物合酶)	亚麻( <i>Linum usitatissimum</i> ); 郁金香( <i>Tulipa gesneriana</i> )的鳞茎; 玉米( <i>Zea mays</i> )	Song and Brash, 1991 Lau <i>et al.</i> , 1993; Higashi <i>et al.</i> , 1985; O'Keefe and Leto, 1989
橡胶颗粒蛋白 RPP	银胶菊( <i>Parthenium argentatum</i> )	Backhaus <i>et al.</i> , 1991; Pan <i>et al.</i> , 1995.

这些蛋白的分子质量在 47~57kDa 之间。大多数成功纯化的 P450 都是植物组织或培养细胞中含量最丰富的, 可见蛋白的丰富度是分离纯化工作成功与否的主要因素。AOS 是许多单子叶植物如玉米、小麦和郁金香微粒体中主要的 P450, 与其他典型的 P450 加单氧酶相比, 其催化反应的转换率高(Lau *et al.*, 1993)。

真核生物细胞色素 P450 纯化存在许多的困难, 但是, 近些年来随着对 P450 的性质有了更多的了解, 提纯方法也有了许多的改进, 如用药物诱导可使 P450 的量增多, 用甘油等多元醇防止血红素辅基的疏水性环境受到破坏, 用氮气防止 P450 的血红素被脂膜的不饱和脂肪酸的过氧化作用所改变等。利用上述这些改进的方法, 已成功地纯化了微

粒体和线粒体的 P450，并重组了 P450 酶系活性，使人们对 P450 的结构和功能有了较深入的了解，也为 P450 基因的克隆提供了关键的结构信息。

## 参 考 文 献

葛兵, 汪静英. 1987. 细胞色素 P450 的提纯与重组. 生物化学和生物物理学报, 19: 454~461

赵剑, 杨文杰, 朱蔚华. 1999. 细胞色素 P450 与植物的次生代谢. 生命科学, 11(3): 127~131

黄俊勇, 冷欣夫. 1992. 微粒体细胞色素 P450、NADPH 细胞色素 P450 还原酶的纯化与重组活性. 生物化学杂志, 8(5): 518~523

Backhaus R A, Cornish, K, Chen S-F, et al. 1991. Purification and characterization of an abundant rubber particle protein from guayule. *Phytochemistry*, 30: 2493

Batard Y, Zimmerlin A, LeRet M, et al. 1995. Multiple xenobiotic-inducible P450s are involved in alkoxycoumarin and alkoxyresorufin metabolism in higher plants. *Plant Cell Environ.*, 18: 523

Blaicher M, Kastner M. 1993. Membrane protein purification. *Pharmacia, Upprola*

Bolwell G P, Bozak K, Zimmerlin A. 1994. Plant cytochrome P450. *Phytochem.*, 37: 1491~1506

Capdevila J, Agosin M. 1977. Multiple forms of housefly cytochrome P450. In: *Microsomes and Drug Oxidations*. Ullrich V (eds.) 1 (19): 144~151. Oxford and New York: Pergamon Press

Capdevila J, Ahmad N, Agosin M. 1975. Soluble cytochrome P450 from housefly microsomes. Partial purification and characterization of two hemoprotein forms. *J. Biol. Chem.*, 250: 1048~1060

Ding X, M J Coon. 1988. Purification and characterization of two unique forms of cytochrome P450 from rabbit nasal microsomes. *Biochem.*, 27: 8330~8337

Feyereisen R, Koener J F, Farnsworth D E et al. 1989. Isolation and Sequence of cDNA encoding a cytochrome P450 from an insecticide-resistant strain of the house fly. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 86: 1465~1469

Fujita T, Shoeman D W, Mannering G J. 1973. Differences in P450 cytochromes from liver of rat treated with phenobarbital and with 3-methylcholanthrene. *J. Biol. Chem.*, 243: 2192

Funae Y, Imaoka S. 1985. Simultaneous purification of multiple of rat liver microsomal cytochrome P450 by high performance liquid chromatography. *Biochem Biophys. Acta*, 842: 119~132

Gabriac B, Werck-Reichhart D, Teutsch H et al. 1991. Purification and immunocharacterization of a plant cytochrome P450: the cinnamic acid 4-hydroxylase. *Arch. Biochem. Biophys.* 288: 302~309

Gibson G G, Orton TC, Tamburini PP. 1982. Cytochrome P450 induction by clofibrate purification and properties of a hepatic cytochrome P450 relatively specific for the 12- and 11-hydroxylation of dodecanoic acid (lauric acid). *Biochem. J.* 203: 161~168

Gonzalez F J, Matsunaga T, Nalgata K et al. 1987. Vebrisoquine 4-hydroxylase: characterization of a new P450 gene subfamily, regulation, chromosomal mapping, and molecular analysis of the DNA rat polymorphism. *DNA*, 6: 149~161

Higashi K, Ikeuchi K, Obara M et al. 1985. Purification of a single form of microsomal cytochrome P450 from tulip bulbs (*Tulipa gesneriana L.*), *Agric. Biol. Chem.*, 49: 2399

Ichikawa Y, Yamano T. 1967. Reconversion of detergent-and sulfhydryl reagent-produced P420 to P450 by polyol and glutathione. *Biochem. Biophys. Acta*, 131: 490~497

Imai Y, Sato R. 1974a. An affinity column method for partial purification of cytochrome P450 from phenobarbital-induced rabbit liver microsomes. *J. Biochem. (Tokyo)*, 75: 689~697

Imai, Y, Sato R. 1974b. A cell-electro phonetically homogenous preparation of cytochrome P450 from liver microforms of Phenobarbital pretreated rabbits. *Biochem. Biophys. Research communication*, 6067: 8~14

Imaoka S, Funae Y. 1986. Ion-exchange high-performance liquid chromatography of membrane-bound protein cytochrome P450. *J. Chromatog.* 375: 83~90

Imaoka S, Funae Y. 1990. Purification and characterization of rat pulmonary cytochrome P450. *J. Biochem.* 108: 33~36

Isa M, Cumps J, Fossoul C. 1992. A new method for the purification of cytochrome P450 from human liver microsomes.

Biomed Chromatogr, 6(5):248~250

Kastner M, Neubert D. 1992. Purification of cytochrome P450 derived from liver microsomes of untreated and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin treated marmoset monkeys. *J. Chromatogr.*, 625: 55~66

Kochs G, Grisebach H. 1989. Phytoalexin synthesis in soybean: purification and reconstitution of cytochrome P450 3,9-dihydroxypterocarpan 6 $\alpha$ -hydroxylase and separation from cytochrome P450 cinnamate 4-hydroxylase. *Arch. Biochem. Biophys.* 273: 543

Kochs G, Werck-Reichhart D, Grisebach H. 1992. Further characterization of cytochrome P450 involved in phytoalexin synthesis in soybean: cytochrome P450 cinnamate 4-hydroxylase and 3,9-dihydroxypterocarpan 6 $\alpha$ -hydroxylase. *Arch. Biochem. Biophys.* 293: 187

Lau S-MC, Harder P A, O'Keefe DP. 1993. Low carbon monoxide affinity allene oxide synthase is the predominant cytochrome P450 in many plant tissues. *Biochemistry*, 32: 1945~1950

Levin W, Ryan D, Lu A Y H. 1974. Preparation of partially purified, lipid-depleted cytochrome P450 and reduced nicotinamide adenine dinucleotid phosphate-cytochrome C reductase from rat liver microsomes. *J. Biol. Chem.*, 249: 1747~1754

Lu A Y H, Coon M J. 1968. Role of hemeprotein P450 in fatty acid  $\omega$ -hydroxylation in a soluble enzyme system from liver microsomes. *J. Biol. Chem.*, 243: 1331~1332

Lu A Y H, Levin W. 1972. Partial purification of cytochrome P450 and P448 from rat liver microsome. *Biochem Biophys Res Commun*, 46: 1334~1339

Lu A Y H, Levin W. 1974. The resolution and reconstitution of the liver microsomal hydroxylation system. *Biochem. Biophys. Acta*, 344: 205~208

Meijer A H, DeWaal A, Verpoorte R. 1993. Purification of the cytochrome P450 enzyme geraniol 10-hydroxylase from cell cultures of *Caharanthus roseus*. *J. Chromatography*, 635: 237

Miyake Y, Gaylor J L, Mason H S. 1968. Properties of submicrosomal particle containing P450 and flavoprotein. *J. Biol. Chem.*, 243: 5788

Miyatake A, Tsubaki M, Hori H et al. 1994. Purification and comparative characterization of cytochrome P450scc (CYPX-IA1) from sheep adrenocortical mitochondria. *Biochem. Biophys. Acta*, 1215: 176~182

Naquira C, White RA Jr, Agosin M. 1980. Multiple forms of *Drosophila* cytochrome P450. In: *Biochemistry Biophysics and Regulation of Cytochrome P450*. Gustafsson JA. (ed). 105~108. Elsevier. North Holland

Nishibayashi H, Sato R. 1968. Preparation of hepatic microsomal particles containing P450 and sole heme constituted and absolute spectra of P450. *J. Biochem. (Tokyo)* 63: 766~771

O'Keefe D P, Leto K J. 1989. Cytochrome P450 from the mesocarp of avocado (*Persea americana*). *Plant Physiol.*, 89: 1141~1149

Pan Z, Durst F, Werck-Reichhart D et al. 1995. The major protein of guayule rubber particles is a cytochrome P450. Characterization based on cDNA cloning and spectroscopic analysis of the solubilized enzyme and its reaction products. *J. Biol. Chem.*, 270: 8487~8494

Petersen M, Seitz H U. 1988. Reconstitution of cytochrome P450-dependent digitoxin 12 $\alpha$ -hydroxylase from cell cultures of foxglove (*Digitalis lanata* EHRH.). *Biochem. J.*, 252: 537

Pidgeon Chasles C, Stevens J, Stephanie Otto et al. 1991. Immobilized artificial membrane chromatography: Rapid purification of functional membrane proteins, *Anal. Biochem.*, 194: 163~173

Ray J W. 1967. The epoxidation of aldrin by housefly microsomes and its inhibition by carbon monoxide. *Biochem. Pharmacol.*, 16: 99~107

Rodgers M W, Zimmerlin A, Werck-Reichhart D et al. 1993. Microsomal heme proteins from French bean: characterization of the cytochrome P450 cinnamate-4-hydroxylase and two peroxidases, *Arch. Biochem. Biophys.*, 304: 74

Ronis M J, Hodgeon E, Dauterman W C. 1988. Characterization of multiple forms of cytochrome P450 from an insecticide resistant strain of house fly. *Pestic. Biochem. Physic.*, 32: 74~90

Roos P H. 1996. Chromatographic separation and behavior of microsomal cytochrome P450 and cytochrome b<sub>5</sub>. *J. Chromatography B.*, 684: 107~131

Ryan D E, Levin W. 1990. Purification and characterization of hepatic microsomal cytochrome P450. *Pharmacol. Ther.*, 45: 153~239

Sato R, Omura T. 1978. Cytochrome P450. Kodansha. Tokyo: Academic Press., 47~72

Sato R, Satake H, Imai Y. 1973. Partial purification and some spectral properties of hepatic microsomal cytochrome P450. *Drug Metab. Disposition*, 1:6

Scharf M E, Neal J J, Marcus C B. 1998. Cytochrome P450 purification and immunological detection in insecticide resistant strain of german cockroach (*Blattella germanica* L.). *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 28(1): 1~9

Schonbrod R D, Terriere L C. 1975. The solubilization and separation of two forms of microsomal cytochrome P450 from the housefly, *Musca domestica* L. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 64: 829~835

Scott J G, Lee SST. 1993. Purification and characterization of a cytochrome P450 from insecticide susceptible and resistant strains of housefly, *Musca domestica* L. before and after phenobarbital exposure. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.*, 24: 1~19

Sibbesen O, Koch B, halkier B A, et al. 1994. Isolation of the herne-thiolate enzyme cytochrome P450<sub>TYR</sub>, which catalyzes the committed step in the biosynthesis of the cyanogenic glucoside dhurrin in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:9740~9744

Sinclair J F, Wood S, Lambrecht L et al. 1990. Isolation of four forms of acetone-induced cytochrome P450 in chicken liver by HPLC and their enzymic characterization. *Biochem J.*, 269(1):85~91

Song W-C, Brash A R. 1991. Purification of allene oxide synthase and identification of the enzyme as a cytochrome P450. *Science*, 253:781~784

Stadler R, Zenk M H. 1993. The purification and characterization of a unique cytochrome P450 enzyme from *Berberis stolonifera* plant cell culture. *J. Biol. Chem.*, 268: 823~831

Sundin M, Warner M, Haaparanta T, et al. 1987. Isolation and catalytic activity of cytochrome P450 from ventral prostate of control rats. *J. Biol. Chem.*, 262: 12293~12297

Sundseth S S, Kennell S L, Waters L C. 1989. Monoclonal antibodies to resistance-related forms of cytochrome P450 in *Drosophila melanogaster*. *Pestl, Biochem. Physical*, 33: 176~188

Tamburini P P, Masson H A, Bains S K et al. 1984. Multiple forms of hepatic cytochrome P450: purification, characterization and comparison of a novel clofibrate-induced isozyme with other major forms of cytochrome P450. *Eur. J. Biochem.*, 139: 235~246

Van der Hoeven T A, Coon M J. 1974. Cytochrome P450 purified to apparent homogeneity from phenobarbital-induced rabbit liver microsomes: catalytic activity and other properties. *Biochem., Biophys. Res. Commun.*, 60: 569~572

Wheelock G D, Scott J D. 1989. Simultaneous purification of a cytochrome P450 and cytochrome b5 from the house fly *Musca domestica* L. *Insect Biochem.*, 1965: 481~488

Wrighton S A, Thomas P E, Molowa D T et al. 1986. Characterization of ethanol-inducible liver N-nitrosodimethylamine demethylase. *Biochem.*, 25: 6731~6735

## 第四章 细胞色素 P450 的种类多样性及其进化

### 4.1 细胞色素 P450 种类的多样性

由于分子生物学方法的进展,人们发现的 P450 基因数量增多。现在已进入基因组学时期,许多新的 P450 基因被报道,至今已知序列的已超过 1000 个(Nelson, 1999a)(图 4.1,表 4.1)。

表 4.1 不同生物 P450 的多样性

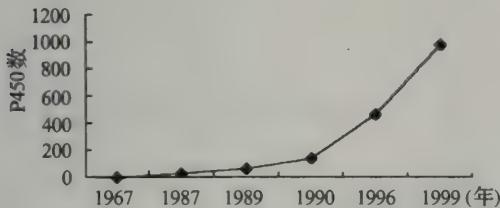


图 4.1 已知 P450 的数量

生物	已知序列	来源
人(动物)	49 + 15P	Nelson, 1999b
拟南芥 <i>Arabidopsis</i> (植物)	186	Nelson, 1999b
<i>Caenorhabditis elegans</i> (线虫)	65	Nelson, 1998
结核分枝杆菌 <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (细菌)	20	Nelson, 1999b
果蝇(昆虫)	60	Feyereisen, 1999

所有细胞色素 P450 具有一非共价结合的血红素和环绕高度保守的半胱氨酸的一段 26 个氨基残基的保守序列,这一半胱氨酸提供血红素铁的第 5 个配体。当血红素铁接受电子被还原后再与 CO 结合,将产生所有 P450 的特征光谱——在 450nm 附近有一吸收峰。具有以上特征的蛋白质称为细胞色素 P450(Gonzalez, 1993)。

细胞色素 P450 的命名以英文缩写 CYP 代表细胞色素 P450, CYP 后顺序跟有数字、字母,数字分别代表家族、亚家族和同工酶(Nebert *et al.*, 1991)。用斜体表示 P450 的基因或 cDNA, 正体代表基因的产物 mRNA 或蛋白质。等位基因则在名称最后冠于 V1, V2 等表示, 假基因用字母 P 表示。根据推导的 P450 的氨基酸序列的相似性将 P450 归于不同的家庭或亚家族, 通常遵循人为的标准, 即同一基因家族成员的蛋白序列有大于 40% 相同的氨基酸残基, 把相同氨基酸残基数大于 55% 的细胞色素 P450 归为同一亚家族(Nelson *et al.*, 1993)。P450 命名法的设计是要反映 P450 序列间的进化关系, 序列的命名依据 P450 基因推定的氨基酸残基的相似程度。由于鉴定 P450 的序列不断增加, 用家族及家族以下的分类单元构建的 P450 种系发生树经常因新序列的加入发生较大的变化, 且有些序列不能与其他序列聚类在一起, P450 种系发生树呈“夹入”式结构。为此 Nelson 又提出了家族以上更高一级的聚类单元, 称为集团(clan), 它的意思是来源于某些共同祖先的不同家族 P450 的集合(表 4.2)。

不同家族的 P450 在不同生物中的分布可见下表。在 37 个动物 P450 家族中, 有 16 个家族仅在哺乳动物中发现, 其他 21 个家族分布于昆虫(6 个)、软体动物(2 个)以及线虫

*C. elegans* (13 个家族)。在哺乳动物中发现的 16 个家族中不仅限于分布在哺乳动物中, 其中许多家族在鸟、鱼和其他脊椎动物中存在, 如家族 1, 2, 3, 4, 11, 17, 19 和 26 包含在硬骨鱼类中, 其中有一些在鸟类、两栖类或爬行类中也发现了它们的成员。

表 4.2 动物 CYP 家族的分布 (Nelson, 1998)

CYP 家族	类群	亚家族
1	哺乳纲	A, B
	硬骨纲	A
	软骨纲	A
	鸟纲	A
2	哺乳纲	A, B, C, D, E, F, G, J
	硬骨纲	K, M, N, P
	鸟纲	H
	甲壳纲	L
3	两栖纲	Q
	哺乳纲	A
4	硬骨鱼纲	A
	哺乳纲	A, B, F
	昆虫纲	C, D, EG, H, J, K, L, M, N, P, Q, R, S
	千足虫	C
5	硬骨鱼纲	T
	哺乳纲	A
6	昆虫纲	A, B, C, D, E, F
	哺乳纲	A, B
7	哺乳纲	A, B
	哺乳纲	A, B
9	昆虫纲	A, B, C
	软体动物门	A
10	哺乳纲	A, B
	软骨纲	A
	硬骨纲	A
	两栖纲	B
12	昆虫纲	A, B
	线虫纲	A, B
14	线虫纲	A
	昆虫纲	A
17	哺乳纲	A
	硬骨纲	A
	软骨纲	A
	鸟纲	A
18	昆虫纲	A
	哺乳纲	A
19	硬骨纲	A
	鸟纲	A
	爬行纲	A
	哺乳纲	A
21	线虫纲	A
	线虫纲	A
23	线虫纲	A
	哺乳纲	A
24	线虫纲	A
	哺乳纲	A
25	线虫纲	A

续表

CYP 家族	类群	亚家族
26	哺乳纲	A
	硬骨纲	A
27	哺乳纲	A
28	昆虫纲	A
29	昆虫纲	A
30	软体动物门	A
31	线虫纲	A
32	线虫纲	A
33	线虫纲	A,B,C,D,E
34	线虫纲	A
35	线虫纲	A,B,C,D
36	线虫纲	A
37	线虫纲	A,B
40	哺乳纲	A
51	酵母	A
	线虫	A
	细菌	A
	有花植物 (angiospermophyta)	A

没有两个种具有完全相同的细胞色素 P450, 比较表 4.3 中人类、大鼠、小鼠的 P450 分布可见这种差异, 甚至黑猩猩与人类的 P450 的种类也不可能一致, 即使他们的 P450 的数量一致, 但它们的序列经 500 万年的歧异, 导致它们的底物特异性可能发生改变。

表 4.3 人、小鼠、大鼠的细胞色素 P450

人	1A1, 1A2, 1B1, 2A6, 2A7, 2B6, 2B79, 2C8, 2C9, 2C18, 2D6, 2E1, 2F1, 2G1, 2J2, 2R1, 2S1, 3A4, 3A5, 3A592, 3A7, 4A11, 4B1, 4F2, 4F3, 4F8, 4F11, 4F12, 4X1, 4Z1, 5A1, 7A1, 7B1, 8A1, 11A1, 11B1, 11B2, 17, 19, 21, 24, 26, 27A1, 27B1, 39A1, 46, 51
小鼠	1a1, 1a2, 1b1, 2a4, 2a5, 2a12, 2b9, 2b10, 2b13, 2b19, 2b20, 2c29, 2c37, 2c38, 2c39, 2c40, 2c44, 2d9, 2d10, 2d11, 2d12, 2d13, 2d22, 2d26, 2e1, 2f2, 2g1, 2j5, 2j6, 2j7, 2j8, 2j9, 2r, 2s1, 3a13, 3a16, 4a10, 4a12, 4a14, 4b1, 4f13, 4f14, 4f15, 4f16, 4f17, 4f18, 4x1, 4z1, 5a1, 7a1, 7b1, 8a1, 8b1, 11a1, 11b1, 11b2, 17, 19, 21, 24, 26, 27a1, 27b1, 39, 46, 51
大鼠	1A1, 1A2, 1B1, 2A2, 2A3, 2B1, 2B2, 2B3, 2C6, 2C7, 2C11, 2C12, 2C13, 2C22, 2C23, 2D2, 2D3, 2D4, 2D18, 2D5, 2E1, 2F4, 2G1, 2J3, 2R1, 2S1, 3A1, 3A2, 3A23, 3A9, 3A18, 4A1, 4A2, 4A3, 4A8, 4B1, 4F1, 4F4, 4F5, 4F6, 4F19, 4X1, 4Z1, 5A1, 7A1, 7B1, 8A1, 8B1, 11A1, 11B1, 11B2, 11B3, 17, 19, 21, 24, 26, 27A1, 27B1, 39, 46, 51

同是人类, 不同的个体间存在 P450 差异, 这种差异表现为 P450 的多态性, 预计人类 50 个 P450 中有 30 个 P450 存在多态位点, 影响 P450 蛋白序列。这种差异有时是重要的, 因为现在已经知道, 只要 1 个氨基酸被取代, 就可以改变 P450 的底物特异性, 如 S474V 突变则 CYP2C2 接受孕酮为底物, 而正常底物为月桂酸 (Nelson, 1999b)。

## 4.2 细胞色素 P450 的种系发生

达尔文指出, 只有一棵真正的生命树, 即所有生物都有共同的祖先。众多的 P450 也

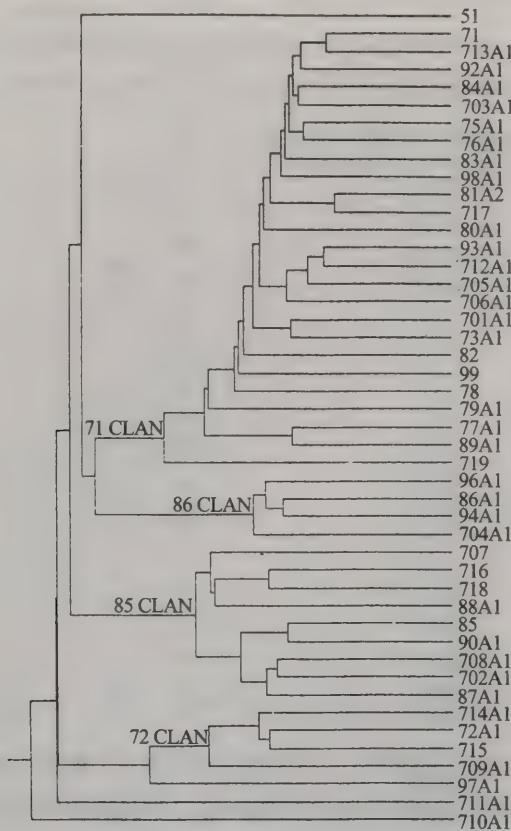


图 4.2 植物 P450 的种系发生

都来源于一个共同的祖先。

#### 4.2.1 植物

植物 P450 可以分为 4 个集团(图 4.2), 最大的一个被称为“A 组(Group A)”植物 P450 集团, 亦称为 71 集团。已知的 47 个植物 P450 家族中有 25 个归于这一集团。另外三个集团分别为 72 集团含 CYP72, 709, 714, 715 家族; 85 集团含 CYP85, 87, 88, 90, 702, 707, 708, 716, 718; 86 集团含 CYP86, 94, 96 和 704。而植物体的 CYP51, 74, 97, 710 和 711 家族归在这些集团外。另外, CYP74 家族的 P450 异常, 其螺旋 I 的序列不保守, 在图 4.2 中未包括。

#### 4.2.2 真菌

真菌 P450 可归为 4 个集团, 还有几个未被归入集团的序列(图 4.3)。52 集团有 3 个家族(CYP52, 63, 505), 53

集团有 7 个家族(CYP53, 57, 507, 65, 60, 62, 58), 54 集团有 5 个家族(CYP54, 506, 68, 69, 503), 64 集团有 5 个家族(CYP64, 66, 502, 501, 504), 另外一些家族不能归在以上任何集团, 即 CYP51, 56, 59, 61 和 67。真菌 P450 已知序列有限, 对其功能的了解也不充分, 如参与麦角甾醇(ergosterol)生物合成(CYP51 和 CYP61), 解毒植物毒素豌豆素(CYP57), 或参与脂类碳代谢(CYP52), 产生毒枝菌素(mycotoxin)(CYP58, 59, 60, 62, 64, 65)。真菌 P450 功能的更详细的阐述见本书第九章。

#### 4.2.3 动物

43 个动物 P450 家族可以较好地聚集成集团(clan)(图 4.4)。线虫(*C. elegans*)集团成员较纯, 仅包含来自 *C. elegans* 的序列, 它可能与 2 集团有共同祖先。这两集团可能看作超集团(supercalan)。3 集团包括哺乳动物的 CYP3 和 CYP5, 昆虫的 CYP6, CYP9, CYP28, *C. elegans* 的 CYP13 和 CYP25, 蛤(clam)的 CYP30, 龙虾(lobster)的 CYP45。

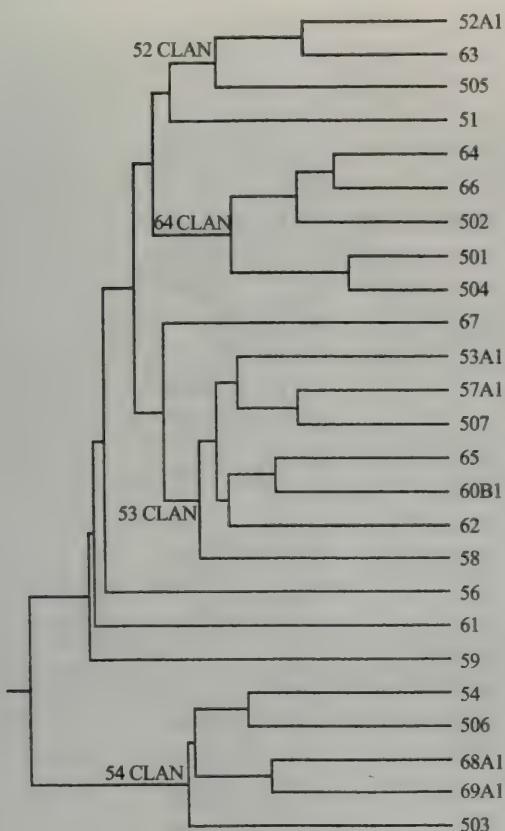


图 4.3 真菌 P450 的种系发生

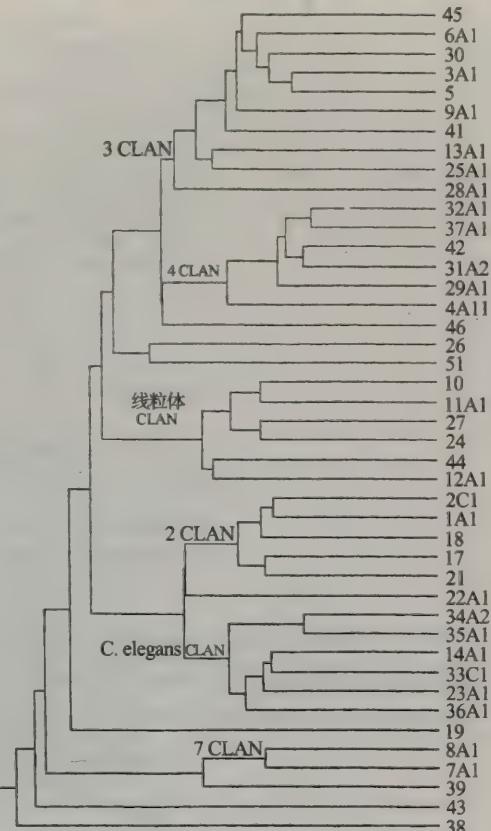


图 4.4 动物 P450 的种系发生

#### 4.2.4 细菌

细菌是 P450 起源的领地, P450 进化的确切时间和进化途径现在还不清楚, 但它肯定出现于大气氧分子存在以前, 图 4.5 是 77 个 P450 的种系发生树, 其中包括来自结核分支杆菌中的 15 个, 另外 5 个类似真核生物 P450, 在此树未包括。

### 4.3 细胞色素 P450 的进化起源与数量壮大

从不同生物类群的 P450 分析发现, 哺乳动物、植物、真菌中都存在 CYP51 基因, 它们的功能是从动物羊毛脂醇(lanosterol)、植物的钝叶鼠曲草醇(obtusifoliol)脱去  $14\alpha$  甲基, 而被认为是真核 P450 进化的祖先, 这一结论可从以下几个方面得到佐证。

#### 4.3.1 蛋白结构分析

Yoshida 等(1997)将真核 CYP51 的蛋白结构以及 *M. tuberculosis* 中的类似 CYP51

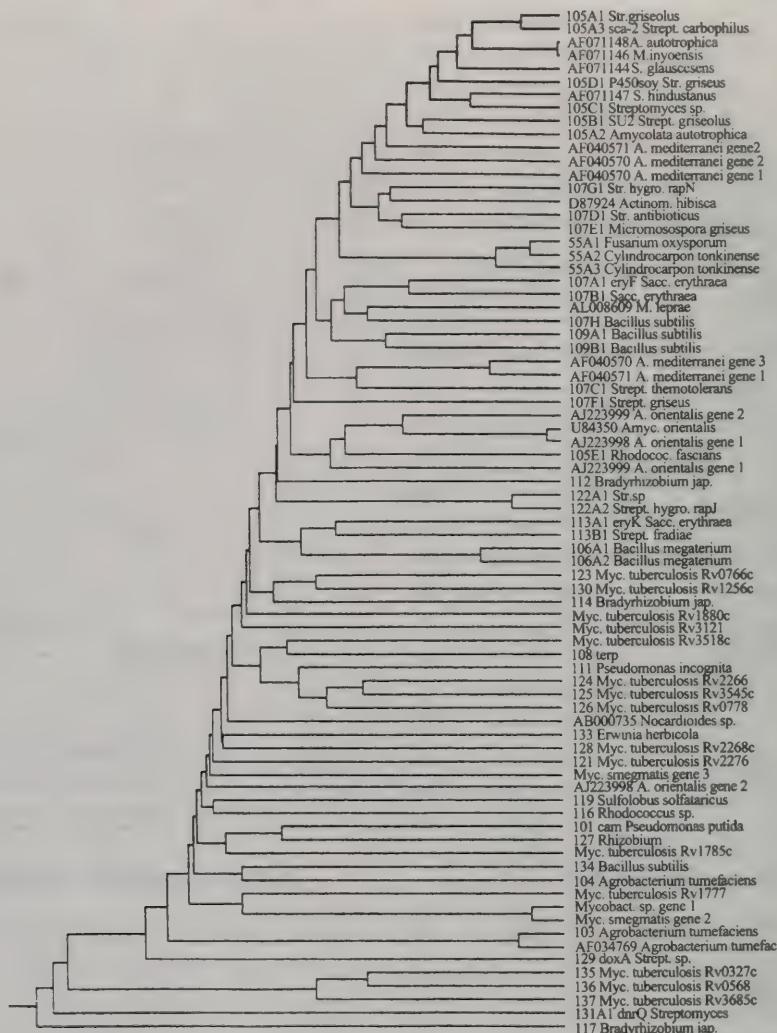


图 4.5 细菌 P450 的种系发生

的蛋白做比较得到的种系发生关系可见图 4.6。分支拓扑学图式为(细菌(植物(真菌, 哺乳动物)))。这与大多数生物界的最可能的系统发育相一致, 表明 CYP51 与生物系统是平行进化的。从原核生物纪(era)至今的整个系统发育历程中, 都有一保守的 P450, 证明了 P450 的原核起源。

#### 4.3.2 功能分析

真核生物 CYP51 的代谢作用, 即甾醇前体的  $14\alpha$ -脱甲基作用是保守的, 氨基酸序列相同性很高, 且在所有真核生物 CYP51 中都找到了特征保守域(覆盖推定的底物识别位点, SRS), 这种高度保守性是由于对大多数真核生物来说, 需要  $14\alpha$ -脱甲基作用以产生功能性甾醇。但在甾醇生物合成途径中哺乳动物、植物、真菌等进行  $14\alpha$ -脱甲基作用的底物

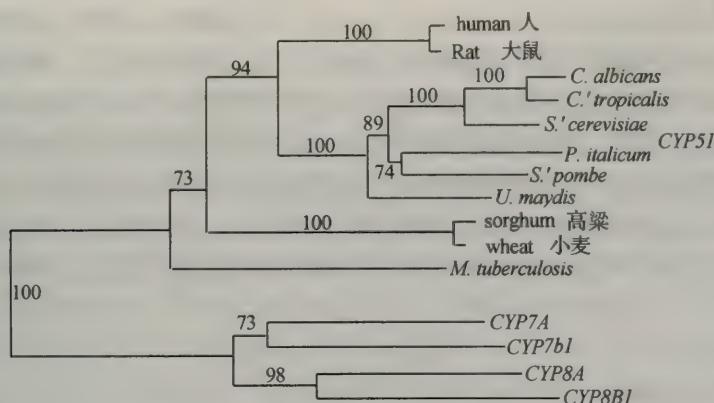


图 4.6 不同类型生物 P450 CYP51 的种系发生

注: *C. albicans*—白色假丝酵母; *C. tropicalis*—热带假丝酵母  
*S. cerevisiae*—啤酒酵母; *S. pombe*—粟酒裂殖酵母  
*U. maydis*—玉米黑粉菌; *M. tuberculosis* 结核分枝杆菌

不同,这种差异是因为 CYP51 酶的底物特异性不同(图 4.7)。这些底物在结构上差异很小且是局部的,CYP51 底物特性的差别可能是因为在底物识别位点发生了氨基酸替代,这在哺乳动物和真菌中都有发现。哺乳动物 CYP 的底物是最原始的甾醇,来源于鲨

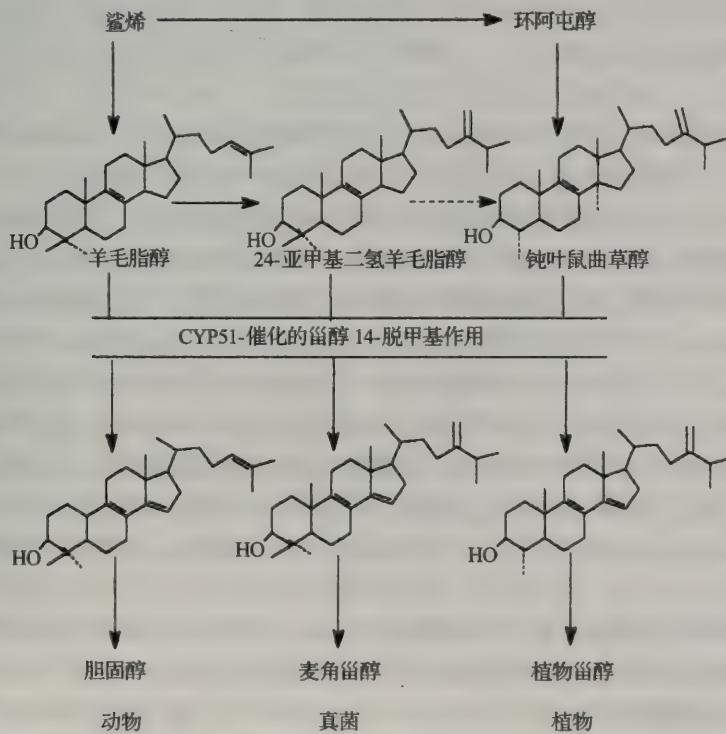


图 4.7 动物、真菌和植物 CYP51 的催化反应

烯(squalene)的氧化环化作用(oxidative cyclization),而真菌的 CYP51 的底物是 24-亚甲基-24,25-二氢羊毛脂醇,是羊毛脂醇的代谢物。这一功能的进化与一般趋势(真菌蛋白比动物和植物同源蛋白进化更快)相一致,因此哺乳动物 CYP51 可能保留真菌更多的 CYP51 蛋白的原始结构。估计现存的真菌 CYP51(以羊毛脂醇为天然底物)是由原始的 CYP51 经修饰形成,CYP51 的修饰改变了它的代谢途径。种系发生树中,CYP51 最近的邻居是 CYP7/8,包括甾醇 7 $\alpha$ -和 12 $\alpha$ -羟化酶(CYP7A1 和 CYP8B1)。这些反应中被氧原子进攻的碳靠近 14 $\alpha$ -甲基碳(C32),这可能表示甾醇代谢的发展是由 P450 加单氧酶的进化引起。

#### 4.3.3 内含子结构

大鼠 CYP51 基因与人 CYP51 基因都有 9 个内含子,且内含子插入部位相同。但从酵母基因组 DNA 文库克隆的包含啤酒酵母(*Saccharomyces Cerevisiae*) CYP51 基因的整个编码区的 DNA 片段却没发现内含子,而意大利青霉(*P. italicum*) CYP51 有 3 个短内含子(60~72bp)。氨基酸序列对比分析显示,*P. italicum* CYP51 基因的第一个内含子对应于大鼠和人基因的第二个内含子,但其他内含子插入部位与哺乳动物基因不同,这些事实表明,在哺乳动物和真菌歧异后,它们的 CYP51 基因的内含子插入或删除大多数情况下是独立而随机的。

#### 4.3.4 5'-侧翼区的结构

哺乳动物 CYP51 是 TATA 盒少、GC 元件丰富的基因,但 *S. cerevisiae* 的 CYP51 基因有一个 TATA 盒存在于它的转录启动子区,且酵母与大鼠 CYP51 的 5'-侧翼区相同性少。酵母 CYP51 基因的表达可因生长环境中的氧浓度而改变,预示存在氧依赖的调控部位。这些事实表明 5'-侧翼区的结构和基因表达的调控机制在哺乳动物与真菌 CYP51 基因十分不同,但它们的编码区保留着它们的共同祖先基因的核心结构。

*S. cerevisiae*(3 个 P450)和裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)(2 个 P450)是子囊菌(*Ascomycete*),它的共同的祖先至少有 2 个 P450 即 CYP51 和 CYP61,可能不多于 2 个,否则这两个谱系不得不失去其他 P450 基因。与 *S. cerevisiae* 更近缘的假丝酵母(*Candida*)有 CYP52 家族的 P450 用作链烷羟化酶,而其他真菌没有,这可能是因为假丝酵母中 P450 发展的结果,而非因为其他种类的 P450 的集成或丢失。类似的 P450 发展发生在曲菌(*Aspergillus*),至少 4 个 CYP 家族(CYP59,60,62,64 被用于黄曲霉素生物合成)。

假设子囊菌的祖先具有 CYP51(羊毛甾醇 14 $\alpha$ -脱甲基酶)和 CYP61(22-甾醇去饱和酶),而无其他 P450,那么,CYP61 是从 CYP51 进化而来,因为 CYP61 在麦角甾醇生物合成途径的较后步骤起作用。要了解 CYP61 什么时候产生,就先要了解真核生物中麦角甾醇生物合成在什么时候出现。麦角甾醇广泛分布于真菌,但在植物或动物中未发现它的同类物。与 CYP61 最相似的 P450 是植物 CYP710 家族,但相似性也只有 30%,由此推测 CYP61 仅从产生真菌的(真菌与动物歧异以后)谱系中进化而来,这意味着动物和真菌

的共同祖先只有 1 个即 CYP51。

以上论点的核心是所有真核生物 P450 来源于 CYP51, 植物、动物和真菌各自 CYP51 进化出一套独立的 P450。除 CYP51 以外, 真菌中没有与植物或动物 P450 家族十分相似的 P450。同样除 CYP51 以外, 植物 P450 也不同于动物 P450。

假设植物、动物和真菌起源于共同的 P450 祖先(12~14 亿年以前), 为什么真菌仅有 2 个 P450 基因, 动物却有 50~80 个, 而植物有 350 个呢? 随着物种向复杂化的进化, 特化的蛋白得到助长。对于以前不存在的新功能的需要, 蛋白可能被复制并发展以满足这些需要。在动物和植物中, 多细胞性(multicellularity)是 P450 重复的驱动力。*Arabidopsis*(350 个 P450)与 *C. elegans* 或哺乳动物的差异反映了一个事实, 即植物在生物化学方面比动物更复杂, 因为植物原地不动, 但要保护其组织免遭动物、病原真菌、病毒和细菌的危害, 它们必须通过物理和化学的手段来实现。植物抗毒素(phytoalexins)和有毒生物碱是植物的生物化学的盔甲和矛, 花的色素是种的标识(identifier), 因此, 必须多样化, 而这两类物质都由 P450 参与催化合成。动物的主要投入在于感觉和运动, 而植物主要在化学, 这可以解释为什么植物比动物具有更多 P450 的原因。

至今在海绵动物中仅发现 1 种 P450(CYP38), 还可能也存在 CYP51, 除此之外, 这一简单的生物的其他的 P450 很少。600 万年以前, 原口动物(protostomes)和后口动物(deuterostomes)的共同祖先存在 CYP51 以及 2, 3, 4 集团的 P450 前体, 至少包含 5 个 P450(图 4.4)。再往回推, 从两侧动物→辐射动物, 其中 P450 的数字还要减少。随着动物进化得越加复杂, 需要增加它们的信号传导能力, P450 可能被自然选择用于形成和降解信号分子如视黄酸、凝血噁烷 A2、甾醇和蜕皮酮等。

动物中, 获得一个 P450, 该 P450 可能成为其进化辐射的遗传前体。在昆虫中, 4 集团得到了大的发展, 它包含 24 个亚家族。脊椎动物发展了 2 集团, 而 *C. elegans* 则选择了 3 集团。昆虫除选择 4 集团外, 还在集团 3 中得到较低程度的发展。对于复杂动物需要 50~80 P450s, 这从线虫及果蝇基因组 P450 序列数据得到支持。

*Arabidopsis* 中已知的 P450 最丰富, 已命名的序列达 186 个, 预计 P450 序列可达 350 个。已知 *Arabidopsis* 41 个家族, 占植物 P450 家族数的 87%, 且植物 P450 的 97%, 随 *Arabidopsis* 基因组计划的完成, 可以在 *Arabidopsis* 中发现, 这说明 *Arabidopsis* 代表了植物的 P450, 预计植物中不会再有太多新的 P450 家族存在。

结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)具有 20 个 P450, 是细菌基因组中 P450 数量最多的种类, 其 P450 种类如此丰富与细菌 P450 种类的平均数有较大的偏差。在细菌 *M. tuberculosis* 中发现一 CYP51 同源物(homolog), 它与人 CYP51 只有 33% 序列相同, 其功能尚不清楚。最近发现 *M. smegmatis* 具有从甲瓦龙酸(mevalonic)合成胆固醇的能力, 这一转化需要 CYP51 活性(14 $\alpha$ -脱甲基酶), 推测是 *M. tuberculosis* 基因的同源物。由于结核细菌是病原菌, CYP51 基因也有可能是来自寄主, 或来自细菌的形成第一个真核 P450 的 P450 前体, 但由于其序列不同于哺乳动物的 P450, 因此不能由“从寄主中获得”得到解释。多种 P450 的存在赋予 *M. tuberculosis* 具有诸如药物氧化功能的潜力, 要弄清该菌 P450 的进化方式, 还需要更多的序列数据。

以前认为, 线粒体 P450 起源于内共生体, 这一假说是基于线粒体 P450 是以皮质铁氧还蛋白作为电子供体这一事实。如果线粒体 P450 随内共生体而来, 则在线虫和低等

真核生物中应该有线粒体 P450 存在,在酵母基因组中仅有 3 个 P450,但无一是线粒体的,在 *C. elegans* 中也未发现任何线粒体 P450,这说明线粒体 P450 可能从外界获得,很可能是由于微粒体 P450 的误定位。这一看法与先前的假设完全不同。皮质铁氧还蛋白系统可能起源于内共生体,误定位(mistarget)于线粒体中的胞质 P450 可以劫持该电子传递系统(皮质铁氧还蛋白)为己用。这暗示线粒体 P450 和微粒体 P450 的电子传递系统的界面是保守的,使得这种转位得以发生(Nelson, 1998)。

## 4.4 细胞色素 P450 的进化

### 4.4.1 P450 的进化

对不同 P450 分子间相互关系的早期研究是根据酶的催化活性、诱导性、免疫交叉反应、亚细胞定位以及所涉及的电子供体等,虽然这为阐明不同 P450 间的关系提供了重要的信息,但在定量研究中,DNA 或蛋白质的一级结构包含的信息量无疑更加丰富(Gotoh, 1993),因此对 P450 进化的了解大多是根据已知 P450 的蛋白序列或由 DNA 推导的蛋白序列的对比分析而来。

通过对已知 P450 的结构相关性的对比及 P450 功能的分析,有以下几点认识:

- 1) 细胞色素 P450 基因是一个古老的基因超家族,它们起源于一个共同祖先,存在于 35 亿年以前,时间上早于药物、动植物相互作用、有机物燃烧的出现(Nelson *et al.*, 1993)。
- 2) 古老的 P450 在有氧呼吸系统占优势前,与生物在无氧条件下获得能量有关;或最早的 P450 以过氧化酶的功能方式来保护细胞免遭活性氧的作用(Gotoh, 1993)。
- 3) P450 的一个很早的功能是对环境中化合物的同化,在樟脑和烷烃可诱导的某些细菌和真菌中的 P450 还遗传着这一早期功能。在更高等生物中,这种同化功能失去作用,P450 与环境物质的相互作用主要发生在生物的保护系统以抵御外来有毒物质(Gotoh, 1993)。
- 4) P450 作为甾醇代谢酶的功能起源很早,在许多歧异较大的 P450 家族中都包含有一些代谢甾醇衍生物的成员(Gotoh, 1993)。
- 5) 对外来物质代谢的 P450 也可能先进化成执行对内源物质代谢的功能,然后起对外来物质代谢的作用(Gonzalez, 1993),由此可以解释 CYP1A(CYP3A 也有可能)P450 可被内源性甾醇诱导的现象(Gonzalez, 1993)。
- 6) P450 可以划分为代谢内源物质和代谢外来物两大功能类型,两类功能的分化可能出现在某类 P450 进化的初始阶段;由于在一些 P450 类群中存在有两种功能的 P450,因而认为两类不同功能的 P450 基因的进化可能相互联系着,有时部分交换它们的功能(Gotoh, 1993)。

P450 功能进化的过程可以归纳为:进化的初期,一些原核生物和简单的真菌用 P450 来保护膜的完整性以及断裂食物以获得能量;随着动植物的歧异,动物开始取食植物,植物越来越多地产生植物抗毒素及其他多环含氧的代谢中间物来抵御动物;数百万年后,含碳化合物开始燃烧,动物除要对天然植物代谢物外,还需对燃烧产物进行解毒(Nebert and Gonzalez, 1987),导致外源物质代谢 P450 的不断分化。

昆虫 P450 也存在两类功能的分化, CYP6 家族成员与外来物质的代谢有关, 其进化关系与哺乳动物 CYP1 及 CYP3 家族较近。CYP4 家族产生于 10 亿年前, 其中 CYP4D 亚家族歧异较早(Dunkov *et al.*, 1996), 在果蝇、家蝇、按蚊中都有该亚家族的代表, 而有些 P450 CYP4 亚家族仅发现于果蝇(CYP4E), 或按蚊(CYP4H)中(Dunkov *et al.*, 1996)。从哺乳动物纯化的 CYP4 蛋白的重组活性通常是脂肪酸或花生四烯酸  $\omega$ -羟基化活性, 表明它们起内源物质代谢而非代谢解毒作用, 蛾蝶 CYP4C1 有相同的作用方式。但昆虫的 CYP4 家族有比哺乳动物更多的成员, 且杀虫剂抗性的 Raleigh-DDT 品系果蝇其 P450 基因 CYP4 E2 表现出超量表达, 这似乎更有可能: 在双翅目昆虫中, CYP4 家族有与哺乳动物 CYP2 家族相同的特征, 即大多数成员起解毒作用, 且进化较快(Dunkov *et al.*, 1996)。

#### 4.4.2 关于细胞色素 P450 进化的机制

变异数在种群中扩散一般通过三个基本过程: 遗传漂变 (genetic drift)、自然选择和分子驱动 (molecular drive) (邱星辉和冷欣夫, 1998)。遗传漂变和自然选择以种群的外部动态为基础, 导致少量新的 P450 基因的出现 (Gonzalez and Nebert, 1990)。而分子驱动是不正常的 DNA 行为引起的基因内在动态的结果, 是大多数新 P450 基因来源和传播的原因 (Gonzalez and Nebert, 1990)。

##### 4.4.2.1 分子驱动假说

分子驱动是指通过随机的或定向的 DNA 的转换 (turnover) 机制使变异数在一个种群中固定下来的过程。DNA 转换包括基因重复、基因转变等分子活动 (Gonzalez and Nebert, 1990)。变异数的产生可以通过 DNA 的转换机制 (Gonzalez, 1993)。

P450 基因遗传多样化的主要原因之一是基因重复, 这一过程可能存在于  $5 \times 10^6 \sim 5 \times 10^7$  年前。重复的基因通过自然选择而被固定下来 (Gonzalez, 1989), 形成具有多基因的基因家族 (Nebert and Gonzalez, 1987)。P450 基因簇的存在可能是基因重复的遗迹。

基因转变 (gene conversion) 作为分子驱动的一个因素, 被认为是 P450 进化的一个主要决定因子。在一些紧密相连的 P450 基因间存在基因转变机制 (Gotoh, 1993)。基因转变允许基因从关系较远甚至无功能的假基因中得到部分 DNA 片段, 以产生具有新功能的 P450 基因同工酶 (Atchison and Adesnik, 1986)。基因转变也可能是近缘关系远的 P450 底物专一性重叠及关系近的同家族 P450 催化性质差异较大的原因。P450 基因的多样化可以由联合基因转换 (combinatory gene conversion events) 促进, 但尚没有明确的证据支持这一说法 (Gotoh, 1993)。Matsunaga 等 (1990) 发现一些独立的基因转变具有与上述相反的效应, 他们测定了大鼠紧密联结的 4 个 CYP2D 基因核苷酸全序列, 发现在 4 个基因的内含子、外显子及侧翼区存在数个相似性高的核苷酸序列, 证明是基因转变的结果; 而相似性极高的序列出现在 P450 的一个关键区段, 即酶活性部位的血红素结合区, 基因转变使编码血红素结合位点周围的核苷酸序列同质化。这似乎表明, 基因转变的作用在自然界是保守的, 可能是为防止偶然的基因破坏的一种修复机制 (Gonzalez and Nebert, 1990)。虽然基因转变现象十分常见, 但它们在 P450 基因的进化中是否起中心作用

用还不能肯定(Gotoh, 1993)。

#### 4.4.2.2 关于自然选择作用

面对不断变化的环境条件, 种群中的遗传变异数或新的 P450 基因可能使生物处于选择有利的地位。反过来, 一个具有新活性的细胞色素 P450 允许动物利用新的植物源而有利于动物的生存(Gonzalez, 1993), P450 的进化不能排除自然选择的作用。

##### (1) P450 基因的适应进化

P450 基因的适应进化已从分子和酶学方面得到证实。在不同的细胞色素 P450 存在一些保守区段, 它们可能对所有 P450 发挥共同的重要的功能作用; 另一方面, 不同 P450 催化特异性的极大多样性可能是由于可变区。可变区改变的两个主要来源是中性随机漂变(neutral random drift)和达尔文正选择(positive Darwinian selection), 而对保守区, 净化(purifying)选择可能占优势。底物识别位点(可变区)往往存在过多的非同义(nonsynonymous)核苷酸替代, 这一现象支持了正选择促进 P450 多样性的假说(Gotoh, 1993)。P450 的适应进化也体现在食性与 P450 解毒活性的相关性中——不同鳞翅目昆虫幼虫中肠的艾氏剂环氧化活性在多食性种类要比寡食性种类高, 而寡食性种类又比单食性种类要高(Krieger *et al.*, 1972)。

##### (2) 动植物“交战”(animal-plant warfare)假说

CYP2 家族 P450 成员数量在过去的 400~800 百万年前明显壮大, 这一发现产生了动植物“交战”假说(Gonzalez, 1993)。该假说的主要内容是, 动物取食植物, 作为防御手段, 植物通过产生植物抗毒素(phytoalexins)以使植物适口性下降或不利于被消化来抗拒动物, 动物为利用食物而合成 P450 酶类来降解这些有毒物质, 植物再以新的化合物来反抗。由此不断交战, 而造成 P450 的多样化及动植物的协同进化。这种类型的交战在植物与真菌中非常典型, 当豌豆(*Pisum sativum*)被真菌(*Nectria haematococca*)侵染时, 诱导豌豆素(pisatin)的产生, 这种植物抗毒素对真菌有毒, 出于抵抗, 真菌诱导 P450 即豌豆素脱甲基酶的表达来解除毒素的毒性以使真菌侵染继续进行。缺乏这种功能的 P450 的真菌变异数很快被豌豆杀死。由此可见, 这种真菌通过产生细胞色素 P450 以分解植物抗毒素很好地适应了豌豆植物(Van Etten *et al.*, 1989)。

细胞色素 P450 构成一个古老的基因超家族, 它们起源于一共同祖先, 存在于 35 亿年前(Nelson *et al.*, 1993)。通过长期的进化产生了对内源性物质和外来物质代谢的两大功能分化, 基因重复(duplication)和适应多样化是 P450 基因进化最强的驱动力(Gotoh, 1993)。

### 参 考 文 献

邱星辉, 冷欣夫. 1998. 昆虫细胞色素 P450 的研究: P450 基因的进化. 昆虫知识, 35(6): 369~372

Atchison M, Adesnik M. 1986. Gene conversion in a cytochrome P450 gene family. Proc. Natl Acad. Sci. USA, 83: 2300~2304

Dunkov B C, Rodriguez-Arnaiz R, Pittendrigh B *et al.* 1996. Cytochrome P450 gene clusters in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Gen. Genet.*, 251: 290~297

Feyereisen R. 1999. Insect Cytochrome P450. *Annul. Rev. Entomol.* 44: 507~533

Gonzalez F J, Nebert D W. 1990. Evolution of the P450 gene superfamily. *Trends Genet.* 6: 182~186

Gonzalez F J. 1989. The molecular biology of cytochrome P450s. *Pharmacol. Rev.*, 40(4):243~288

Gonzalez F J. 1993. Cytochrome P450 evolution and nomenclature. In: Schenkman JB, GreimH (eds). *Handb. Exp. Pharmacol.*, 105, pp211~219, Berlin: Springer, Germany

Gotoh O. 1993. Evolution and differentiation of P450 genes In: Omura T. *et al* (eds). *Cytochrome P450* (2nd edition), pp255~272. Kodansh VCH.

Krieger R I, Feeny P P, Wilkinson C F. 1972. Detoxication enzymes in the guts of caterpillars: an evolutionary answer to plant defense. *Science*, 172:579~581

Matsunaga E, Umeno M, Gonzalez F J. 1990. The rat P450 IID subfamily: complete sequences of four closely linked genes and evidence that gene conversions maintained sequence homogeneity at the heme-binding region of the cytochrome P450 active site. *J. Mol. Evol.* 30:155~169

Neupert D W, Nelson D R, Coon M J *et al*. 1991. The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping and recommended nomenclature. *DNA Cell. Biol.*, 10:1~14

Neupert D W, Gonzalez F J. 1987. P450 gene: structure, evolution and regulation. *Annu Rev. Biochem.*, 56:945~993

Nelson D R. 1999a. Cytochrome P450 and the individuality of species. *Arch. Biochem. Biophys.*, 369(1):1~10

Nelson D R. 1998. Metazoan cytochrome P450 evolution. *Comparative. Biochem. Physiol. Part C.*, 121:15~22

Nelson D R. 1999b. Cytochrome P450s in humans. <http://drnelson.ulm.edu/~humanP450.htm>.

Nelson D R, Kamataki T, Waxman D J *et al*. 1993. The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes and nomenclature. *DNA Cell Biology.*, 12(1):1~51

Van Etten H D, Matthews D E, Matthews P S. 1989. Phytoalexin detoxification: Importance for pathogenicity and practical implications. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 27:143~164

Yoshida Y, Noshiro M, Aoyama Y *et al*. 1997. Structural and Evolutionary studies on sterol 14-Demethylase P450(CYP51) the most conserved P450 monooxygenase: II . Evolutionary Analysis of Protein and Gene Structures. *J. Biochem.*, 122: 1122~1128

## 第五章 哺乳动物细胞色素 P450 及其功能

哺乳动物细胞色素 P450 酶系的生物功能广泛,它可以对大量的内源化合物如甾类化合物、胆酸、脂肪酸、前列腺素、白细胞三烯(leukotrienes)以及生物胺等进行氧化、过氧化以及还原代谢作用。此酶系还能代谢范围很广的外源化合物,包括药物、环境污染物和醇类。外源化合物的代谢可能产生有毒的代谢产物,有些代谢产物可能诱发肿瘤的产生与发展,下表中列举了部分 P450 及其催化的反应。

表 5.1 部分 P450 基因型和催化反应(Strobel *et al.*, 1997)

P450	催化反应
1A1	7-乙氧基试卤灵-O-脱乙基作用;7-乙氧基香豆素-O-脱乙基作用; 睾丸甾酮 6 $\beta$ -羟基化作用
1A2	17 $\beta$ -雌二醇 2-羟基化作用;苯胺对-羟基化作用; 甲基苯异丙基苯胺 N-脱甲基作用
2A1(雌性表达较高)	睾丸甾酮 7 $\alpha$ -羟基化作用;孕甾酮 7 $\alpha$ -羟基化作用
2A2(雄性特异的)	睾丸甾酮 15 $\alpha$ -和 7 $\beta$ -羟基化作用;甲基苯异丙基苯胺 N-脱甲基作用; 氨基芘 N-脱甲基作用
2B1	氨基芘 N-脱甲基作用;甲基苯异丙基苯胺 N-脱甲基作用; 环己烯巴比妥 3-羟基化作用
2B2	甲基苯异丙基苯胺 N-脱甲基作用
2C6	杀鼠灵 7-羟基化作用
2C7(雌性表达较高)	7-乙氧基试卤灵-O-脱乙基作用;7-苯氧基试卤灵-O-脱乙基作用
2C11(雄性特异的)	睾丸甾酮 2 $\alpha$ -和 16 $\alpha$ -羟基化作用;苯巴比妥氧化作用;乙基吗啡羟基化作用;7-乙氧基试卤灵-O-脱乙基作用;7-乙氧基香豆素-O-脱乙基作用; 氨基芘 N-脱甲基作用
2C12(雌性特异的)	硫酸类固醇 15 $\beta$ -羟基化作用;7-乙氧基试卤灵-O-脱乙基作用;(较 2C11 更有效)。
2C13(雄性特异的)	7-乙氧基香豆素-O-脱乙基作用;甲基苯异丙基苯胺 N-脱甲基作用
2D1	debrisoguine 4-羟基化作用;bufuralol 1-羟基化作用;丙咪嗪 2-羟基化作用
2E1(雌性表达较高)	乙醇氧化作用;苯胺 对-羟基化作用
3A1	睾丸甾酮 2 $\beta$ -和 15 $\beta$ -羟基化作用
3A2(雄性特异的)	6 $\beta$ -雄性激素氧化作用
3A4	睾丸甾酮、孕甾酮和雄烯二酮的 6 $\beta$ -羟基化作用
4A	脂肪酸和前列腺素的 $\omega$ -羟基化作用
19(芳化酶)	睾丸甾酮和雄烯二酮的芳构化作用
17A1	17 $\alpha$ -羟基化作用
21A1	孕甾酮和 17-羟基孕甾酮的 21-羟基化作用

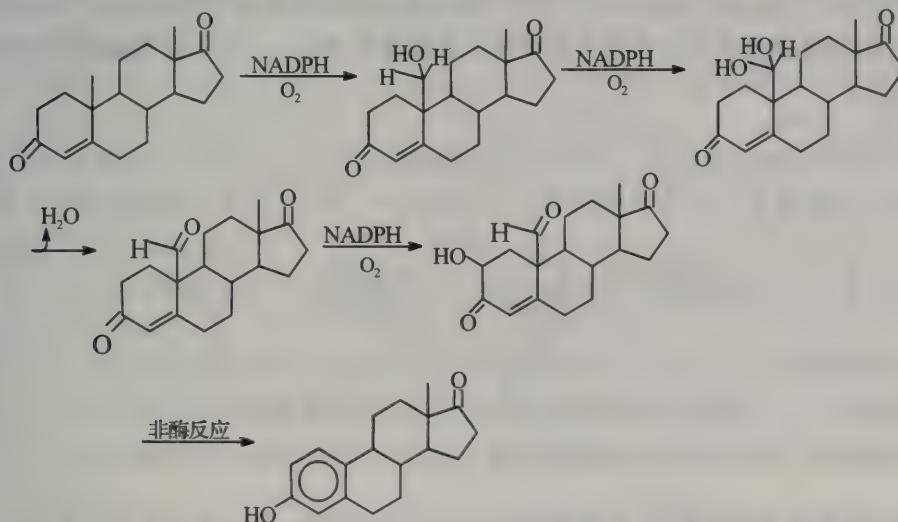
由上表可以看出,多型的细胞色素 P450 能有效地交替催化代谢。少数底物对某异构型是特异性的。有些 P450 基因型对性别是特异的,即其仅对一种性别表达或对某一种性别的表达程度较高。例如,2C11、2C13、2A2 和 3A2 是雄性特异型,而 2C12 为雌性特异型。

## 5.1 哺乳动物细胞色素 P450 酶系对体内化合物的合成与代谢

P450 酶系在代谢哺乳动物内源性物质中,最重要的功能是:①对类固醇类、激素的生物合成,②维生素(A、D 及其代谢产物)的羟基化,③脂肪酸的羟基化。此外,对内源性生物碱如可待因(codeine)和吗啡(morphine)在脑内的合成以及可待因转化为吗啡等都需要 P450 酶系的催化。另外一种重要生理活性物质如二十(烷)酸(20c-eicosanoid)也是由花生四烯酸(arachidonic acid)经 P450 酶系催化合成的。这类化合物还包括重要的信息分子,如前列腺素类(prostaglandins)、凝血噁烷类(thromboxanes)和白细胞三烯类(leukotrienes)。

### 5.1.1 P450 在雄激素(androgen)转化为雌激素(estrogen)的作用

雄激素芳构化为雌激素是甾族激素生物合成的重要反应之一。参与此反应的有三步酶催化的羟基化作用,反应式如下:



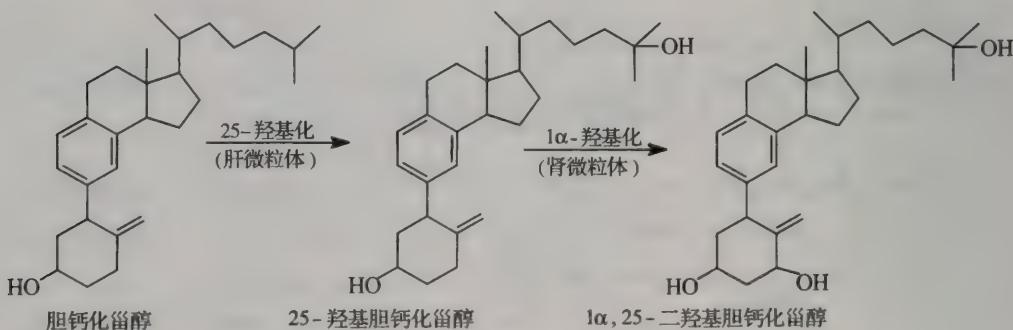
开始两步反应发生在 C-19 甲基上,使其产生醛。最终的羟基化反应是在 2-位上,并转化为雌激素。在生物转化过程中需要氧和 NADPH,所以每生成 1 mol 的雌激素则需要 3 mol 的 NADPH 和 3 mol 的氧(Thompson *et al.*, 1974)。能使芳环化合物芳构化的 P450 酶,又称 P450 芳化酶(P450aromatase),存在于精巢(足细胞和莱迪希氏细胞)、卵巢、胎盘、脑和脂肪组织中。芳化酶复合体位于内质网能使胎盘和其他组织中的 C-19 类固

醇转化为雌激素。此外,芳化酶活性也可发现在胎盘和其他组织的线粒体制备液中。依据它对雄甾烯二酮(androstanedione),19-去甲睾甾酮(19-nortestosterone)和16 $\alpha$ -羟基睾甾酮(16 $\alpha$ -hydroxytestosterone)的相对活性以及对一氧化碳的敏感性,此酶系在人胎盘线粒体部分与微粒体部分性质相似。对线粒体内外膜的亚组分进行芳化酶的活性分析时,发现它主要与线粒体外膜有关(Canick *et al.*, 1978)。

P450 和 NADPH-细胞色素 P450 还原酶存在于内质网,但它们参与了芳化酶反应。19-去甲雄甾烯二酮(19-norandrostanedione)和19-去甲睾甾酮的芳构化作用可被一氧化碳抑制,但睾甾烯二酮的芳构化作用对一氧化碳不敏感,也不被 P450 抑制剂甲吡酮抑制。睾甾烯二酮和19-去甲睾甾酮与胎盘微粒体作用形成 I 型差光谱,这表明底物与低自旋高铁 P450 相结合。睾甾烯二酮诱导 I 型差光谱的量几乎等于胎盘微粒体 P450 减少的一氧化碳差光谱的数值。这似乎表明芳化酶的底物也是胎盘微粒体 P450 的底物,胎盘微粒体 P450 参与了这些类固醇的反应。芳化酶复合体的其他底物,如19-羟基睾甾烯二酮和19-氧化睾甾烯二酮也与 P450 形成 I 型差光谱 (Thompson *et al.*, 1974)。P450 与底物和睾甾烯二酮是竞争性的结合,这表明芳构化反应可能是在相同的活性部位进行的,由单酶复合体对所有类固醇进行芳构化 (Ortiz de Montellano, 1986)。

### 5.1.2 P450 在维生素 D 代谢中的作用

目前公认的维生素 D<sub>3</sub> (cholecalciferol, 胆钙化甾醇) 是经紫外光照射皮肤中的前体 7-去氢胆固醇(7-dehydrocholesterol)生成。胆钙化甾醇本身的生物活性较小,而胆钙化甾醇经 P450 羟基化形成具活性的代谢物——活性维生素 D (1 $\alpha$ ,25-二羟基胆钙化甾醇)。反应式如下:



胆钙化甾醇的氧化代谢,必须通过 25-羟化的中间体。此反应主要在肝脏,有些羟化作用也在肠和肾脏中进行。25-羟基胆钙化甾醇在 1 $\alpha$  位置上进一步羟化,生成 1 $\alpha$ ,25-二羟基胆钙化甾醇(Gray *et al.*, 1971)。一般认为胆钙化甾醇的 25-羟化作用场所是肝脏的实质细胞(parenchymal cell),专属的胆钙化甾醇 25-羟化酶位于肝脏的内质网,此酶是一种典型的微粒体 P450 羟化酶。羟基化反应需要微粒体细胞色素 P450, NADPH-细胞色素 P450 还原酶以及二月桂酰基磷脂酰胆碱(dilauroylphosphatidylcholine) (Hayashi *et al.*, 1984)。肝线粒体也含有羟化胆固醇和胆钙化甾醇的 25-羟化酶,此酶系有三种组

分:即专属的 P450,铁-硫蛋白和黄素蛋白。后两个组分可被牛的肾上腺皮质铁氧还蛋白和皮质铁氧还蛋白还原酶替代。线粒体酶系统对胆钙化甾醇的  $K_m$  值远大于微粒体系统,由此看来可能是线粒体系统转化胆钙化甾醇为 25-羟基胆钙化甾醇,随后进一步羟化生成维生素 D (Ortiz de Montellano, 1986)。与肝微粒体 25-羟化酶对比,肾脏线粒体中含有 1 $\alpha$ -羟化酶,此酶系含有 P450、铁-硫蛋白、黄素蛋白和 NADPH-rodoxin 还原酶。后两种酶在重组系统中可被肾上腺皮质铁氧还蛋白或肾上腺皮质铁氧还蛋白还原酶代替。通过测定线粒体 1 $\alpha$ -羟化酶还原当量试验表明,反应中所需的 NADPH 来自线粒体内三羧酸循环中间体的氧化,也可能是由能联转氢酶 (energy-linked transhydrogenase) 产生 (Ghazarian *et al.*, 1974)。

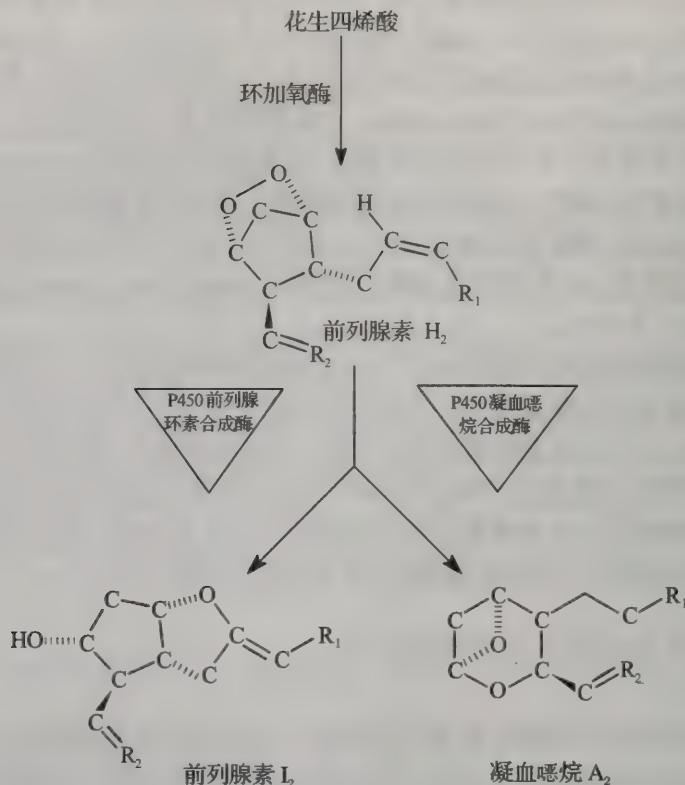
25-羟基胆钙化甾醇的代谢途径除了 1 $\alpha$ -羟化作用外,还有 24R-羟化作用。24R,25-二羟基胆钙化甾醇是维生素 D 的主要代谢产物。24-羟化作用产生于各种组织,特别是在肾和肠中。此作用在肾线粒体是经依赖-P450 系统催化,类似于 1 $\alpha$ -羟化酶的催化。虽然 24-羟化作用依赖于 P450,但不同于 1 $\alpha$ -羟化作用。总之,维生素 D 的许多代谢途径及其生物学意义目前尚不甚清楚,预期将来对维生素 D 进行羟化作用的各型 P450 进一步纯化,将会对它的活性和合成的调控有更深入地了解。

### 5.1.3 P450 在脂类羟化反应中的作用

脂类是不同类型 P450 的底物,这些不同类型的 P450 能催化三类加氧反应:即  $\omega$ -和  $\omega$ -1-羟化、环氧化以及烯丙位氧化作用。鼠肝细胞色素 P450 能催化脂肪酸如月桂酸在  $\omega$  和  $\omega$ -1 位置上的羟化作用。此外,用鼠肾皮层微粒体也证明了细胞色素 P450 催化月桂酸的  $\omega$ -羟化 (Ellin *et al.*, 1972; Jakobsson *et al.*, 1970)。有些研究证明前列腺素 (prostaglandin) 可被加单氧酶代谢,形成  $\omega$ -羟化衍生物 (Okita *et al.*, 1981)。前列腺素是 P450 的天然底物,此酶在体内起消除前列腺素的作用。在妊娠兔的肺中曾纯化出前列腺素  $\omega$ -羟化酶细胞色素 P450 (P450 $_{\text{pg}} - \omega$ ),但此酶在非妊娠兔的肺内未曾测出 (Williams *et al.*, 1984)。

聚不饱和脂肪酸是由微粒体 P450 催化代谢为烯烃环氧化合物,如由花生四烯酸经 P450 酶合成的类花生酸。这类化合物包括两个重要的信息分子,如前列腺素 I<sub>2</sub> 和凝血恶烷 (thromboxane) A<sub>2</sub> 是依赖于细胞色素 P450 酶的催合成的。花生四烯酸经环加氧酶 (cyclooxygenase, 又称前列腺素合酶) 转化为不稳定的前体 (前列腺素 H<sub>2</sub>), 前列腺素 H<sub>2</sub> 进一步经 P450 前列腺环素合酶转化为前列腺素 I<sub>2</sub>, 或经 P450 凝血恶烷 (thromboxane) 合酶转化为凝血恶烷 A<sub>2</sub>, 反应式如下:

此反应与肝微粒体 P450 的典型反应的不同之处在于,上述反应不需要电子和分子氧,仅是前列腺素的前体分子内的原子重排。在微粒体内花生四烯酸经 P450 酶催化进行烯丙位氧化反应,生成羟基廿碳三烯酸 (hydroxyeicosatrienoic acid)。此产物有趋药活性 (chemotactic activity) 和参与发炎反应 (inflammatory response) (Samuelsson, 1980)。另一类是环氧廿碳三烯酸,它在肾脏中有重要的生理功能,这些分子能改变  $\text{Na}^+$  和  $\text{K}^+$  的运转,水的吸收和血管收缩。因为环氧廿碳三烯酸有这些功能,所以它在高血压的发生中具重要作用。有研究结果表明,用高盐食物喂大鼠后肾脏中的 P450 浓度显著地增加。因



遗传变异而不能产生环氧廿碳三烯酸的大鼠,喂高盐食物后,这些大鼠就会发展为高血压。

有研究结果表明,一种特定型的 P450 酶参与一氧化氮(NO)的合成。已发现一氧化氮有某些重要的生理作用,如作为神经递质,血压的调节剂和杀灭入侵病原的毒素等。合成一氧化氮的两种酶称一氧化氮合成酶(一种在脑中,另一种在免疫系统的巨噬细胞内),它包括两个域:一部分含有细胞色素 P450 域,而另一部分为还原酶域(含有两个黄素分子)。这种结构类型也见于细菌的细胞色素 P450 酶系。

P450 酶也能使内源性的生物碱产生变化,如目前已知的两种生物碱可待因和吗啡能在脑内和少数其他组织内合成,在合成过程中 P450 酶起催化作用。P450 催化反应还包括可待因转化为吗啡(Guengerich, 1993)。

## 5.2 哺乳动物不同组织中的细胞色素 P450 及其功能

在肝内质网和多数其他哺乳动物组织的细胞色素 P450 酶系催化各种内源和外源化合物的代谢,其中包括药物、甾类化合物、前列腺素类、化学致癌物以及其他外源有毒物质。此酶系不仅在许多药物、化学致癌物和其他有毒物质的解毒作用中起着很重要的作用,而且承担了催化某些底物的代谢活化生成高反应性的自由基、烷化的或芳基化的中间体,再与细胞大分子反应产生中毒或致癌。那么这些药物或其他外源有毒化合物,经细胞

色素 P450 酶系解毒代谢后如何排出体外的呢？在药物和外源化合物代谢作用一般可分为两个不同的相，为 I 相和 II 相代谢 (phase I, II metabolism) 即初级和次级代谢。首先是 I 相药物代谢，它包括药物的羟基化作用、环氧化作用和催化活化的其他反应等。羟化或环氧化的底物，再进入 II 相药物代谢的次级反应。II 相反应包括葡糖苷酸作用、硫酸化作用、谷胱甘肽-S-转移和其他轭合反应。在轭合反应中加入强亲水基团到羟化或环氧化的原底物上。活化的原底物的轭合产物是强水溶性的，因此易于通过胆汁、尿液或粪便等途径排出体外。

某些外源化合物经 I 相药物代谢反应后的产物比原化合物更具毒性（如多芳烃苯并芘）。许多化合物的环氧化和羟化的代谢产物比未经代谢的原化合物的致癌性更强。在某些情况下，细胞色素 P450 与环氧水解酶共同使苯并芘活化为致癌和致突变的代谢物。这样，细胞色素 P450 在药物和其他外源化合物的代谢作用，就超出了解毒作用的范围。

某些轭合的代谢物还将进一步代谢，即称 III 相药物代谢作用 (phase III drug metabolism)，作用部位可能在血-肝，血-肾或血-脑等屏障 (Ghersi-Egea *et al.*, 1994)。此代谢过程易于轭合代谢物的清除，例如促使雌激素葡糖苷酸在血-肝屏障内进入胆汁后排出 (Strobel *et al.*, 1997)。

### 5.2.1 脑中的细胞色素 P450 及其功能

脑和其他神经组织中依赖细胞色素 P450 的药物代谢系统的存在与功能，已有许多报道 (Ravindranath *et al.*, 1995; Ravindranath and Boyd, 1995; Volk *et al.*, 1995)。神经组织的细胞色素 P450 系统对大脑的保护起重要作用，如单胺氧化酶在脑内使 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四羟基吡啶 (MPTP) 活化为 1-甲基-4-苯基-2,3-二羟基吡啶𬭩离子 (MPDP<sup>+</sup>)，然后转化为 1-甲基-4-苯基吡啶𬭩 (MPP<sup>+</sup>)，导致多巴胺神经元损害，产生似帕金森病症状。MPTP 药物浓度低时，可被 P450 2D 代谢为无毒物。在受药浓度高时 (如滥用者) 则 P450 2D 的代谢途径被单胺氧化酶代谢途径取代，生成有毒的代谢产物并引起临床症状。因此，可以认为 CYP2D 异构型 (isoform) 在人或动物中起着解毒作用。

细胞色素 P450 在鼠脑 (Guengerich and Mason, 1979) 和人脑 (Ravindranath *et al.*, 1989) 已被鉴定。不同的鉴定方法证明脑内存在许多细胞色素 P450 异构型，表 5.2 列举的仅是部分 P450 酶系及其鉴定方法。P450 酶系遍及全脑，但不同的异构型在脑内的分布有所不同。免疫组织化学研究表明，P450 在神经元和胶质细胞中的分布是特异的和选择性的 (Hansson *et al.*, 1990; Hagihara *et al.*, 1990)，P450 1A1, 2B1, 2E1 和 3A 存在于小脑 Bergaman 神经胶质 (Hansson *et al.*, 1990; Warner *et al.*, 1988)。

P450 酶在脑中的表达水平是相对低的，脑中 3,4-苯并芘和乙氧香豆素的羟基化作用仅为肝脏的 5% (Srivastava *et al.*, 1983)。虽然，脑 P450 活性仅为肝脏的 1%~10%，但在脑内 P450 系统中 P450 水平有微小的变化，就可能显著地影响脑的功能。脑内 P450 的影响可能还包括神经递质和类固醇激素的合成与降解 (Tyndale *et al.*, 1991; Warner and Gustafsson, 1995)。

表 5.2 P450 酶系在鼠脑中的表达 (Strobel *et al.*, 1997)

基因型	鉴定方法	文献
CYP1A1	免疫组织化学	Adams <i>et al.</i> , 1992; Strobel <i>et al.</i> , 1995;
	Western/PCR	Bergh and Strobel, 1992; Ahlgren <i>et al.</i> , 1990
CYP1A2	RT-PCR	Ghersi-Egea <i>et al.</i> , 1989
CYP2A1	RT-PCR	Ghersi-Egea <i>et al.</i> , 1989
CYP2B12	免疫组织化学	Adams <i>et al.</i> , 1992; Strobel <i>et al.</i> , 1995;
	Western/PCR	Guengerich and Mason, 1979; Bergh and Strobel, 1992
CYP2C7	RT-PCR	Ghersi-Egea <i>et al.</i> , 1989
CYP2C11	RT-PCR	Warner <i>et al.</i> , 1988
CYP2D	PCR/酶活性	Adams <i>et al.</i> , 1992; Warner <i>et al.</i> , 1988;
	cDNA/克隆	Naslund <i>et al.</i> , 1988
CYP2E1	免疫组织化学	Fang and Strobel, 1978; Adams <i>et al.</i> , 1992;
	Western/PCR	Kapitulnik <i>et al.</i> , 1987; Ghersi-Egea <i>et al.</i> , 1987
CYP3A	活性睾酮	Ravindranath and Boyd, 1995
CYP3A9	脑库 cDNA 克隆	Wang <i>et al.</i> , 1996
CYP4A	PCR/Western	Kapitulnik <i>et al.</i> , 1987; Wyss <i>et al.</i> , 1995
CYP4F	脑库 cDNA 克隆	Kawashima and Strobel, 1995
CYP11A1 (P450scc)	Chol ssc 活性	Cesi <i>et al.</i> , 1993
CYP17A1	酶活性	Roselli, 1991
CYP19 (芳构酶)	酶活性	Kohler <i>et al.</i> , 1988
CYP27 (P45027)	活性	Sundseth and Waxman, 1992
还原酶	免疫组织化学	Hansson <i>et al.</i> , 1990; Warner and Gustafsson, 1994;
	Western/PCR	Michnovicz <i>et al.</i> , 1987; Stromstedt <i>et al.</i> , 1994;
	通过杂交/酶活性	Kawashima and Strobel, 1995; Bergh and Strobel, 1992

脑内细胞色素 P450 催化雄激素芳构化为雌激素反应, 已引起人们的广泛关注。已有证明, P450 芳构酶 (P450arom) 在性发育和性功能方面起着关键作用 (Sanghera *et al.*, 1991)。测定神经元和培养的胶质细胞、分离的少突神经胶质细胞和星胶质细胞等的芳构酶活性发现, 唯有神经元具有芳构酶活性, 胶质细胞不能使睾酮芳构化 (Cesi *et al.*, 1993)。

细胞色素 P450 的两种线粒体类型, P450scc 和胆固醇 27-羟化酶 (P450<sub>27</sub>) 在脑内参与胆甾醇的代谢作用。脑内脱氢表雄酮 (dehydroepiandrosterone, DHEA) 是通过 P450scc 合成的 (Goascogne *et al.*, 1987), 它能调控 NMDA 和 GABA<sub>A</sub> 受体, 并可能对脑发育、老化和记忆等起作用 (Warner and Gustafsson, 1995)。在患脑膜黄瘤病 (cerebro-tendinous xanthomatosis) 的病人中, 发现细胞色素 P450 畜醇 27-羟化酶基因中含有点突变, 这导致畜醇在中枢神经系统中沉积和进行性的神经功能障碍 (Cali *et al.*, 1991)。

### 5.2.2 肝脏中的细胞色素 P450 及其功能

细胞色素 P450 酶系催化大量的亲脂性的外源化合物代谢。P450 酶系的表达主要是哺乳动物的肝脏。参与肝脏药物代谢的许多 P450 已被鉴定,其中有 3 个 P450 基因族(即 CYP1, CYP2, CYP3)承担大量的肝脏内药物代谢作用。

肝微粒体 P450 酶系能催化大量的内源和外源化合物的代谢,反应包括碳羟化作用、杂原子加氧作用、脱烷基作用和环氧化作用等。此外,它还能催化还原反应。底物经 P450 酶系催化代谢所形成的代谢产物较母体化合物更具亲水性,因而易于排出体外。在某些情况下,所形成的亲电性的代谢产物与细胞的亲核物质反应导致中毒或致癌的危害。某些 P450(即 CYP1A, CYP3A, CYP2E1)还能被外源化合物诱导(Monstrey and Vereckey, 1995)。为了进一步阐明肝 P450 酶系的催化功能和表达调控,现就 3 个 P450 基因族的重要 P450 作以下论述:

#### 5.2.2.1 CYP1 家族

##### (1) P4501A1

人和鼠的 CYP1A1 是 P450 基因族中研究得较为清楚的两个基因(Nebert *et al.*, 1991)。人 1A1cDNA 是从二噁英(TCDD)处理 MCF-7 人胸癌细胞产生的 cDNA 库首次分离出来的,为肝外(extrahepatic)的 P450,它可在肝外组织因吸烟和多环芳烃(PAH)诱导产生(Quattrochi and Tukey, 1989; Pasanen *et al.*, 1988)。P4501A1 酶的诱导作用是通过一系列的分子反应。TCDD 是 P450 1A1 的最强的诱导剂之一。某些动物体内具有此化合物的受体,叫芳基烃水解酶受体("Ah"受体)。TCDD 与 "Ah"受体结合,然后释放出热激蛋白(hsp-90),使受体-TCDD 复合体与芳基烃受体核转移酶(ARNT)结合。此复合体进入细胞核,再与 P450 1A1 基因的特定部位结合。这一特定部位含有已知为外源化合物调节因子的核苷酸特定序列。此复合体与调节因子的结合使得其他蛋白质(转录因子)接近 P450 基因的启动子部位,引发 mRNA 的合成。

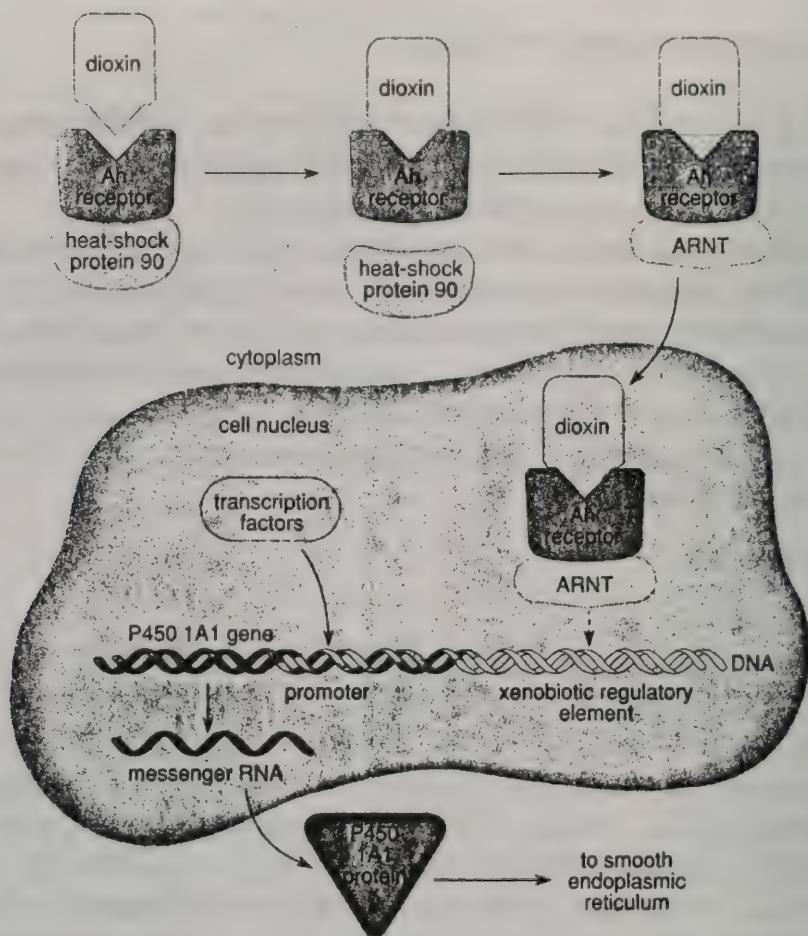
##### (2) P450 1A2

P450 1A2 是作为乙酰氧乙苯胺(phenacetin)O-脱乙基酶纯化得到的(Disterlath *et al.*, 1985),并发现它在成年人的肝中表达(Wrighton *et al.*, 1986)。咖啡碱的 3-脱甲基作用是 1A2 活性的标记。其他因素,如身体运动、摄食烧焦的食肉或十字花科蔬菜等都能诱导 1A2 活性水平增高(Vistisen *et al.*, 1991)。此外,药物相互作用如 omeprazole(质子泵抑制剂)可诱导体内和原代单层培养的人肝细胞中 1A2 的活性(Diaz *et al.*, 1990)。从癌症流行病学来看,判断一个人对芳基胺诱导癌症的敏感性,可用咖啡碱 3-脱甲基作用探查体内 1A2 活性。另外可用甲基黄嘌呤衍生物 furafylline 测定 P450 1A2 在体内外的代谢能力,此化合物是人 1A2 有效的和选择性的抑制剂(Sesardic *et al.*, 1990)。

#### 5.2.2.2 CYP2 家族

##### (1) CYP2A 亚族

P450 2A 亚族曾在大鼠和小鼠中已进行了广泛研究。在大鼠中,2A 亚族包括 2A1,



(Guengerich, 1993.)

注: dioxin: TCDD(二噁英), Ah receptor: 芳基烃水解酶受体, heat-stock protein 90: 热激蛋白 90, ARNT: 芳基烃受体核转移酶, cytoplasm: 细胞质, cell nucleus: 细胞核, transcription factor: 转录因子, promoter: 启动子, xenobiotic regulatory element: 外源物调节因子, messenger RNA: mRNA, P450IA1 protein: P450IA1 蛋白, P450IA1 gene: P450IA1 基因, smooth endoplasmic reticulum: 光滑内质网。

2A2 和 2A3。其中 2A1 原归类于 P450a 或 壬甾酮  $7\alpha$ -羟化酶。2A2 的氨基酸序列与 2A1 有关, 但并不表明它对壬甾酮羟化作用的专属性相同。而且, 2A1 和 2A2 在未经处理的大鼠体内的表达也不同, 2A2 也不受 PAH 的诱导(Ryan and Levin, 1990)。2A3 是 2A 亚族中惟一能在肺中表达, 并受 3-甲基胆蒽的诱导的 P450(Kimura *et al.*, 1989)。

在小鼠中 2A 亚族包括 2A4 和 2A5。从氨基酸序列与大鼠肺 2A3 极为相似(Burkhart *et al.*, 1990)。2A4 为小鼠肝壬甾酮  $15\alpha$ -羟化酶, 2A5 为香豆素  $7$ -羟化酶。2A5 对壬甾酮的羟化作用的专属性比 2A4 更广泛。有趣的是大鼠的 2A P450 不能有效地催化香豆素  $7$ -羟化作用。此外, 2A5 可被苯巴比妥或吡唑诱导(Aida and Negishi, 1991)。大小鼠的 2A 亚族之间的主要差异不仅在底物的专属性, 而且也表现在表达的调控方面。

由人肝制备的微粒体得到的 2A 亚族对  $7\alpha$ -或  $15\alpha$ -睾甾酮不能进行羟化作用, 此微粒体可羟化香豆素。Raunio 等(1988)指出, 人肝微粒体含有一种蛋白在免疫化学上与小鼠 2A5 有关, 并且能使香豆素羟化。从人肝 cDNA 库中, 分离出两个 cDNA, 根据其氨基酸序列归为 2A 亚族(Yamano *et al.*, 1990)。将克隆在表达系统中表达, 只有 2A6 生成功能酶(香豆素 7-羟化酶)。以氨基酸序列与其他 2A 亚族成员比较, 2A6 约 85% 类似于大鼠肺 2A3, 而与肝 2A 型相似小于 70%。纯化的 2A6 能催化香豆素的羟化作用和 7-乙氧基香豆素 O-脱乙基作用, 而且这两种活性均可被 2A6 产生的抗体抑制(Yun *et al.*, 1991)。从不同的人肝微粒体样品的香豆素 7-羟化酶活性比较结果表明, 人 2A6 是香豆素羟化酶(Wrighton *et al.*, 1987; Waxman *et al.*, 1991)。

#### (2) CYP2B 亚族

苯巴比妥处理大鼠可在肝脏中诱导 2B1 和 2B2 的表达, 但两者中只有 2B2 能在未经处理的动物中表达(Ryan and Levin, 1990)。2B1 和 2B2 的底物专属性是重叠的, 但 2B1 对众多的底物的活性远大于 2B2(Ryan and Levin, 1990; Guengerich *et al.*, 1982)。CYP2B 亚族中的 2B6(Nebert *et al.*, 1991), 其氨基酸序列近似于 2B1(Yamano *et al.*, 1989), 但人 CYP2B6 基因是否在动物中表达和酶活性水平尚未进一步证明。

#### (3) CYP2C 亚族

已被鉴定的 CYP2C 基因在大鼠中有 7 个, 兔中有 8 个(Nebert *et al.*, 1991)。经基因组分析在 CYP2C 亚族中, 人至少有 7 个基因(Ged *et al.*, 1988)。2C5 又称孕酮 21-羟化酶在兔肝中表达。人肝 2C8 能代谢维生素 A 和维生素 A 酸, 并能活化催化甲基苯异丙基苄胺(benzphetamine)的 N-脱甲基作用(Leo *et al.*, 1989), 但人的 2C8 不能代谢孕酮(Wrighton *et al.*, 1987)。

2C 亚族中另外两个 P450 基因型是 2C9 和 2C10。它们可催化环己烯巴比妥和 1-丁基-3-对甲苯磺酰基脲(tolbutamide)的羟基化作用(Ged *et al.*, 1988; Shimade *et al.*, 1986)。此外, 2C9 在酵母中表达, 发现其 S-甲基妥英(mephenytoin) 4'-羟化酶活性很低(Yasumori *et al.*, 1989)。2C9 的等位变异数在哺乳动物细胞系表达, 能催化 1-丁基-3-对甲苯磺酰基脲羟化作用和 R-甲基妥英的 4-羟化作用, 但不能使 S-甲基妥英-4-羟化(Relling *et al.*, 1989)。2C10 不能代谢甲基妥英, 但可代谢 1-丁基-3-对甲苯磺酰基脲和环己烯巴比妥(Brian *et al.*, 1989)。磺胺苯吡唑(sulfaphenazole)和甲基妥英是 1-丁基-3-对甲苯磺酰基脲 4-羟化作用的抑制剂, 二者都可抑制 2C9 和 2C10(Back *et al.*, 1988; Miners *et al.*, 1988)。

P450 2C18 是从人肝分离得到的, 它能催化 S-甲基妥英-4'-羟化作用, 又称 S 甲基妥英-4' 羟化酶(Sribastava *et al.*, 1991)。在 S-甲基妥英 4-羟化过程中利福平(rifampicin)可增强其作用, 而类固醇则使羟化作用降低(Zhou *et al.*, 1990)。

#### (4) CYP2D 亚族

用大鼠咪基四氢异喹胍(debrisoquine) 4-羟化酶 2D1 制备的抗体免疫印迹实验表明, 人肝微粒体含有一种相关的基因型, 被命名为 2D6(Nebert *et al.*, 1991)。在测定人肝样品中, 2D6 的水平与微粒体咪基四氢异喹胍 4-羟化酶活性紧密相关(Disterlath and Guengerich, 1984)。有研究证明, 2D6 在体内外均可催化可待因的脱甲基而生成吗啡, 并认为可待因药理学上的这些变化, 直接与 2D6 的多态性及代谢作用有关。此外, 2D6 在

体内对外源化合物的代谢作用,也可用 2D6 特异的抑制剂如奎尼丁(quinidine)进行共处理来确定因奎尼丁对 2D6 的亲和性而其本身又不被其代谢,这样可精确地评价 2D6 对外源化合物的代谢中的作用(Zanger *et al.*, 1988)。

### (5) CYP2E 亚族

2E 亚族在毒理学方面是很重要的代谢系统。在大鼠中,2E 亚族仅有一个成员即 2E1。大鼠 2E1 的活性及表达调控已进行广泛地研究。2E1 可被许多有机小分子化合物所诱导,所以它有非同寻常的毒理学意义。2E1 通常催化大量低分子化合物转化为比其母体化合物化学反应性更强的代谢产物。首次分离的 2E1 作为低  $K_m$  值的 N-亚硝基二甲胺 N-脱甲基酶,它可被吡唑、丙酮、异烟肼、乙醇和异丙醇等诱导。大鼠 2E1 也受生理状态的诱导,例如禁食、多尿症和肥胖,而导致丙酮或其他酮类化合物的积累。已有研究证明,2E1 可催化大量的普通毒物的代谢,其中包括氯化的小分子有机化合物如四氯化碳、乙醇类、N-亚硝基二甲胺、苯胺、苯、丙酮和乙酰氨基苯等(Yang *et al.*, 1990)。

许多试验数据表明,人 2E1 与大鼠 2E1 有很好的相关性。人 2E1 是用大鼠 2E1 的抗体与固相载体的免疫亲和层析纯化的。经结构研究表明,人与鼠的 2E1 是极为相似的(Wrighton *et al.*, 1986)。人 2E1 也能代谢 N-亚硝基二甲胺、苯胺、乙醇、四氯化碳和乙酰氨基苯(Ekstrom *et al.*, 1989; Raucy *et al.*, 1989),以及大量低分子量的致癌物,其中包括氯仿、二溴(或二氯)化乙烯、氨基甲酸乙酯、氨基甲酸乙烯酯、苯和苯乙烯等。一种肌肉松弛剂——氯羟苯唑(chlorzoxazone)在体内可被人 2E1 专属的羟基化(Peter *et al.*, 1990)。二硫龙(disulfiram)和甲氧基补骨脂素(methoxypsoralen)是人 2E1 的专属抑制剂(Guengerich *et al.*, 1991; Tinel *et al.*, 1987)。

#### 5.2.2.3 CYP3 家族

3A 亚族能对很多临床的和毒理学方面的重要药物进行代谢,并且又可被类固醇、大环内酯抗体、咪唑抗真菌剂和苯巴比妥等诱导。3A1 和 3A2 两个基因都是从大鼠中鉴定的。3A1 可被糖皮质素(glucocorticoid)诱导,但不能在未经处理的成年动物中表达。然而,3A2 不被糖皮质素诱导,只能在成年雄鼠体内表达(Gonzalez *et al.*, 1986)。在人体内的 P450 3A 亚族,至少有 4 个基因,即 CYP3A3, 3A4, 3A5 和 3A7。这些基因的表达调控与大鼠 3A1 或 3A2 似乎是不平行的。Molowa 等(1986)和 Beaune 等(1986)分离出两个不同的 3A cDNAs, 分别命名为 3A3 和 3A4。这两个 3A P450s 的氨基酸序列非常相似。用组织化学方法测定其表达和酶活性水平,二者也无区别。然而,用对 3A3 或 3A4 专属性的寡核苷酸探针表明, mRNA 编码的 3A4 在人肝中的表达的程度要明显地高于 3A3 (Bork *et al.*, 1989)。总之,人肝的 3A 亚族对大量的结构各异的内源和外源化合物的代谢起主要作用。3A 亚族代谢的内源化合物包括各种类固醇,如睾甾酮、孕甾酮、皮质甾醇和雄甾烯二酮等的  $6\beta$ -羟基化作用。脱氢皮质甾酮 3-硫酸酯的  $16\alpha$ -羟基化作用(Kitada *et al.*, 1987)。对外源化合物的代谢,包括红霉素、硝基地平(nifedipine)、1,4-二氢吡啶、cydosporine、利度卡因盐酸盐(lidocaine), 黄曲霉素(aflatoxin)、奎尼定、 $17\alpha$ -乙炔雌甾二醇、植物碱千里光宁(sennpcioniné)、甲基苯异丙基苄胺以及艾氏剂等。

3A 亚族中另一基因是 3A5。3A5 的代谢功能与 3A3 和 3A4 相比有一定的局限性。它不能代谢红霉素、奎尼定或  $17\alpha$ -乙炔雌甾二醇,但能代谢睾甾酮、硝基地平、皮质甾醇

和脱氢皮质甾酮 3-硫酸酯,其代谢速率要慢于 3A4 (Wrighton *et al.*, 1990)。

P450 3A7 是人胎儿较重要的 P450,它在胎儿体内的表达水平很高,但在成年人肝中未曾鉴定出 (Wrighton *et al.*, 1989; Wrighton *et al.*, 1990)。3A7 催化脱氢皮质甾酮 3-硫酸酯的 16 $\alpha$ -羟基化作用的效率比 3A3、3A4 和 3A5 更高。怀孕的母鼠用糖皮质素处理后的胎儿肝,可诱导 3A,而未经处理的胎鼠肝不含与 3A 有关的 P450。孕妇用外源类固醇诱导对胎儿 3A7 的表达尚未见报道。一些其他 P450 基因,包括 1A2、2C8、2C9 和 2E1 等在人胎儿肝中均未测出 (Wrighton *et al.*, 1988)。

总之,大鼠和人的 3A 亚族的表达和调控是不相似的,大鼠 3A 亚族代谢的所有底物不都能被结构相关的人基因亚族代谢。所以,由动物得到的关于 3A 基因亚族表达调控或其代谢功能的试验结果推广应用到人类时,必须高度地慎重。

### 5.2.3 小肠细胞色素 P450 对药物代谢

小肠是通过摄入食物和液体接触外源化合物。在肠黏膜细胞中酶的生物转化使一些疏水性的外源化合物排入肠腔,或经轭合作用后排出体外。初级代谢主要是防止外源物质分布到身体的其他部分。生物转化也可能使外源物质活化为对生物体有毒的物质。在小肠内支配生物转化作用的系统是 P450 酶系。关于小肠 P450 酶系的基因调控与代谢以及这些酶的功能在毒理学上的重要性,现作以下简要论述。

#### 5.2.3.1 细胞色素 P450 在人小肠的定位

用 P450 3A3 单克隆抗体研究表明,在人小肠近幽门的地方 P450 的含量最高,而远端较低。小肠壁绒毛吸收柱的上皮细胞和肥大细胞显示最强的免疫反应性,而在杯状细胞或在小囊的上皮细胞免疫染色未检出 (Murray *et al.*, 1988)。用 Western 印迹技术确定 NADPH-P450 还原酶位于小肠组织的肠细胞和绒毛顶端的浓度最高 (Hall *et al.*, 1989)。

#### 5.2.3.2 细胞色素 P450 在动物的小肠定位

在未经处理的大鼠十二指肠用免疫印迹法已检出 P450 1A1,但它在空肠和回肠中低于检测水平。P450 2B1 和 3A1 及 3A2 也存在于上述三个部位,而且在十二指肠中的水平最高 (de Waziers *et al.*, 1990)。P450 3A1/2 mRNA 在未处理的成年 Holtzman 大鼠的小肠中也有较高的水平 (Simmons and Kasper, 1989)。Western 印迹法和酶活性测定未处理的大鼠肠,未发现 P450 1A1,2B1 或 2B2 存在 (Sesardic *et al.*, 1990; Christou *et al.*, 1987)。用定位技术在未处理大鼠的小肠细胞中证明有 P450 2B1,而且从小囊到绒毛的最高顶端在量的水平来看也最高。所以,各种 P450 在肠内的分布是随肠的长度不同而异。P450 在绒毛中的浓度也是随绒毛的部位而变化,在绒毛的顶端 P450 浓度最高。用巴比妥诱导大鼠,则总 P450 和 P450 2B1 浓度的变化也随小肠的长度而异 (见下表) (Kaminsky and Fasco, 1991)。

表 5.3 大鼠小肠不同距离的总 P450 和 P450 2B1 浓度(Kaminsky and Fasco, 1991)

沿肠距离	微粒体蛋白中总 P450	微粒体蛋白中 P4502B1
	/pmol/mg	/pmol/mg
1/3 近侧	208.0±22.4	116.0±6.4
1/3 中部	210.0±40.2	137.0±14.2
1/3 远侧	99.9±34.0	50.4±24.2

### 5.2.3.3 肠细胞色素 P450 的调控

#### (1) 外源化合物的诱导作用

关于外源化合物对肠 P450 的诱导作用及不同动物肠内 P450 活性见下表。由表内结果表明,大鼠肠内 P450 酶系由外源化合物诱导,如苯巴比妥诱导 P450 2B1。

表 5.4 部分外源化合物对肠 P450 酶系的诱导作用(Kaminsky and Fasco, 1991)

诱导剂	处理途径	动物种类	P450	P450 浓度 /pmol/mg	诱导活性
苯并芘	口服	C57BL/6N 小鼠	P450 1A1	370	AHH
	口服	蟾蜍			AHH
雌甾二醇	腹膜内注射	雌大鼠		80	AHH, ECOD
地塞米松	口服	大鼠	P450p		红霉素脱甲基酶
N-苯基咪唑	胃灌	大鼠	P450 3A	248	EROD, 对-硝基茴香醚和红霉素脱甲酶
N-(2-萘甲基)咪唑	胃灌	大鼠	P450 3A	236	EROD, 对-硝基茴香醚和红霉素脱甲酶
cimelidine	口服	大鼠		43.4	AHH, ECOD
二硫龙	口服	大鼠		44	AHH
钴	口服	大鼠		41	AHH
乙醇	口服	大鼠		26	AHH
乙醇	口服	大鼠		38	AHH,
TCDD	胃灌	大鼠		133	AHH, EROD
β-萘黄酮	口服	大鼠		150	EROD, ECOD
PcBs	口服	日本鹤		530	EROD, ECOD
Aroclor 1242	胃灌	大鼠		103	AHH, EROD
Aroclor 1254		大鼠	P450 1A1		
		大鼠	P450 2B1	589	
3-甲基胆蒽	腹膜内注射	大鼠		75	AHH, EROD
	腹膜内注射	大鼠		120	7,12-二甲基苯并蒽
	腹膜内注射	大鼠		116	AHH, 雌甾二醇-2-羟化酶
	腹膜内注射	C57BL/6N 小鼠	P450 1A1		AHH
	腹膜内注射	豚鼠		260	
	腹膜内注射	兔		340	
苯巴比妥	腹膜内注射	大鼠	P450 2B1	25	7,12-二甲基苯并蒽
	腹膜内注射	大鼠	P450 2B1	333	EROD, ECOD
	腹膜内注射	兔		400	
	腹膜内注射	豚鼠		231	ECOD

注: AHH: 芳烃羟基化作用, ECOD: 乙氧香豆素 O-脱乙基作用, EROD: 乙氧试卤灵脱乙基作用。

3-甲基胆蒽诱导 P450 1A1, 地塞米松(dexamethasone)诱导 P450 3A 的两个基因型。诱导作用的最有效途径是诱导药物的口服处理。药物处理在1 h内芳烃羟化酶(AHH)活性迅速增加。

在多环芳烃化合物诱导 P450 中, Ah-受体的作用已由苯并芘诱导 C57BL/6N 鼠肠的 AHH 活性所证实。但在 DBA/2 鼠内用相同的方法诱导就不能表达 Ah-受体的功能(Kaminsky and Fasco, 1991)。

有许多报道比较了肝和小肠 P450 酶系及其调节作用。一般来说, 肠 P450 酶系对诱导剂的反应要比肝 P450 酶系更迅速, 可能是因为其作用更直接一些(Hasing *et al.*, 1989)。未经处理的肝和肠的微粒体对不同底物代谢的动力学参数( $V_{max}$ ,  $K_m$  值)有明显的不同。这些结果表明, 肝和肠两种器官诱导的 P450 型功能上的不同, 如日本鹌鹑用 2, 4, 2, 4-四氯联苯口服处理, 可诱导肠 P450 为 3.3 倍于对照组, 而用 3, 4, 3, 4-四氯联苯处理时, 则无诱导效应, 但 3, 4, 3', 4'-四氯联苯在肝脏内却有明显地诱导作用(Miranda *et al.*, 1987)。有人以系列的 15 种类黄酮化合物诱导大鼠肝和肠的微粒体 P450, 并以 ECOD 活性来衡量, 结果表明, 5, 6-苯并黄酮, 7, 8-苯并黄酮和黄酮分别加到微粒体制备液中, 肝的活性全都增加, 但肠的活性全被抑制, 其余的 12 种类黄酮在肝和肠的微粒体代谢全被抑制(Vernet 和 Siess, 1986), 这说明两种组织有不同的 P450 调控机制。

表 5.5 在鼠肝和肠微粒体代谢的动力学参数(Kaminsky and Fasco, 1991)

底物	肝		肠	
	$K_m/(10^{-5} \times \text{mol/L})$	$V_{max}/[\text{nmol}/(\text{min} \cdot \text{mg})]$	$K_m/(10^{-5} \times \text{mol/L})$	$V_{max}/[\text{nmol}/(\text{min} \cdot \text{mg})]$
7-乙氧基香豆素	6.2	0.123	1.9	0.8
联苯	1.7	0.24	17	3.3
甲基苯异丙基苯胺		1.3		13

## (2) 饮食组分的诱导作用

饮食组分在肠 P450 调控中起重要的作用。饮食成分中铁的限定, 会迅速地使肠 P450 降低到低于测定值; 缺乏硒时其作用相似, 但其影响要低一些。汤菜(brussels sprouts)会增加 AHH 活性 9.8 倍, ECOD 活性 3.2 倍, P450 活性 1.9 倍; 油煎的肉和食物脂肪明显地增加 EROD 活性; 缺乏维生素 A 的食物能增加肠 P450 活性, 而富含维生素 A 食物则降低肠 P450 活性。肠 P450 酶系的表达也受食物中胆固醇含量的影响。一般来说, 食物中含胆固醇浓度越高, 则肠内 P450 活性也越高(Hietanen *et al.*, 1987)。

### 5.2.3.4 细胞色素 P450 和肠毒理学

小肠的 P450 催化外源化合物代谢与致癌作用的关系一直不甚清楚。这种代谢作用对结肠癌发生速率存在某些相关因素: ①半合成食物降低了小肠 P450 活性和增加了实验动物发生结肠癌的速率, ②食物中脂肪含量高会降低小肠 P450 活性, 并促进大鼠结肠癌的发生, ③某些蔬菜增加小肠 P450 活性, 素食者可减少患结肠癌的风险, ④缺乏铁会降低小肠 P450 活性, 而能导致人的胃肠癌。那些特异的外源化合物能在肠内活化为致癌剂, 虽然存在着这种可能性, 然而尚无实验证明。有一种假设是, 小肠 P450 酶系作为体内对外源化合物的净化系统, 防止或减少外源物通向小肠, 这样即可防止或降低其致癌

功能。

小肠对癌已产生的抗性,这是因为它含有很强的 P450 代谢功能。细胞代谢更新速率越高,假定的那些致癌物的迁移就越快(Kaminsky and Fasco, 1991)。

2,2,2-三氟乙醇在大鼠肠内可能是由 P450 2E1 代谢为三氟乙醛,再转化为三氟乙酸后可对肠产生严重的损害,其后果是发生细菌感染最终致死(Kim *et al.*, 1987)。

可见,P450 酶系能催化代谢各种不同组织中具生理功能的内源性底物。了解这些酶的活性与水平的调控机制,对我们理解各种不同的生物过程的调控是很重要的。阐明这些酶的编码基因结构,将对 P450 演化历史有更详细的了解。对代谢内源性底物的各型 P450 酶的研究也将使人们对人类某些疾病的分子基础有更深的了解。细胞色素 P450 在生物对致癌物的反应方面也是非常重要的,在某些情况下,致癌物不会引起生物损害,除非有特异 P450 酶存在。

### 参 考 文 献

Abdelgadir S E, Resko J A, Ojeda S R *et al.* 1994. Androgens regulate aromatase cytochrome P450 messenger ribonucleic acid in rat brain. *Endocrinology*, 135(1):395~401

Adams M D, Dubnick M, Kerlavage, A R *et al.* 1992. Sequence identification of 2375 human brain genes. *Nature*, 355: 632~634

Ahlgren R, Warner M, Gustaffson Cloning J A. 1990. A rat P450 26-hydroxylase cDNA: Comparison of tissue distribution with rat P450scc, in *Drug Metabolizing enzymes: Genetics, Regulation and Toxicology* (M. Ingelman-Sundberg, J. A. Gustaffson, and S. Orrenius (eds.)), Karolinska Institute, Stockholm, 161

Aida K, Negishi M. 1991. Posttranscriptional regulation of coumarin 7-hydroxylase induction by xenobiotics in mouse liver: mRNA stabilization by pyrazole. *Biochem.*, 30: 8041

Back D J, Tjia J K, Karbwang J *et al.* 1988. In vitro inhibition studies of tolbutamide hydroxylase activity of human liver microsomes by azoles, suphonamides and quinolines. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 26:23

Beaune P H, Unbenhauer D R, Bork R W *et al.* 1986. Isolation and sequence determination of a cDNA clone related to human cytochrome P450 nifedipine oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 83: 8064

Bergh A F, Strobel H W. 1992. Reconstitution of the brain mixed function oxidase system: purification of NADPH-cytochrome P450 reductase and partial purification of cytochrome P450 from whole rat brain. *J Neurochem.* 59(2):575~581

Bolwell G P, Bozak K, Zimmerlin A. 1994. Plant cytochrome P450. *Phytochem.*, 37:1491~1506

Bork R W, Muto T, Beaune P H *et al.* 1989. Characterization of mRNA species related to human liver cytochrome P450 nifedipine oxidase and the regulation of catalytic activity. *J. Biochem.*, 264:910

Brain W R, Srivastava P K, Umbenhauer D R *et al.* 1989. Expression of a human liver cytochrome P450 protein with tolbutamide hydroxylase activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem.*, 28:4993

Butler M A, Iwasaki M, Guengerich F P *et al.* 1989. Human cytochrome P450PA (P4501A2), the phenacetin O-deethylase, is primary responsible for the hepatic 3-demethylation of caffeine and N-oxidation of carcinogenic arylamines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 86:7696

Cali, J. J., Hsieh C. L., Franke U *et al.* 1991. Mutations in the bile acid biosynthetic enzyme sterol 27-hydroxylase underlie *Cerebrotendinous xanthomatosis*. *J. Biol. Chem.*, 266:7779~7783

Canick J A, Ryan K J. 1978. Properties of the aromatase enzyme system associated with the mitochondrial fractions of human placenta. *Steroids*, 32:499~509

Cesi P N, Melcangi R C, F Celotti *et al.* 1993. Distribution of aromatase activity in cultured neurons and glia cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 44(4~6):637~639

Christou. M, Wilson N M, Jefcoate C R. 1987. Expression and function of three cytochrome P450 isozymes in rat extra-

hepatic tissues, *Arch. Biochem. Biophys.*, 258:519

De Waziers I, Cugnenc P H, Yang C S et al. 1990. Cytochrome P450 isoenzymes, epoxide hydrolase and glutathione transferases in rat and human hepatic and extrahepatic tissues, *J. Pharm. Exp. Ther.*, 253:387

Diaz D, Fabre I, Daujat M et al. 1990. Omeprazole is an aryl hydrocarbon-like inducer of human hepatic cytochrome P450, *Gastroenterology*, 99:737

Disterlath L M, Guengerich F P. 1984. Characterization of a human liver cytochrome P450 involved in the oxidation of debrisoquine and other drugs by using antibodies raised to the analogous rat enzyme, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 81:7348

Disterlath L M, Reilly P E B, Martin M V et al. 1985. Purification and characterization of the human liver cytochrome P450 involved in debrisoquine 4-hydroxylation and phenacetin O-deethylation, two prototypes for genetic polymorphism in oxidative drug metabolism, *J. Biol. Chem.*, 260:9057

Ekstrom G, von Bahr C, Ingelman-Sundberg M. 1989. Human liver microsomal cytochrome P450IIIE1. Immunological evaluation of its contribution to microsomal ethanol oxidation, carbon tetrachloride reduction and NADPH oxidase activity. *Biochem. Pharmacol.*, 38:689.

Ellin A, Jakobsson S V, Schenkman J B et al. 1972. Cytochrome P450 of rat kidney cortex microsomes: its involvement in fatty acid  $\omega$ - and ( $\omega$ -1)-hydroxylation. *Arch. Biochem. Biophys.* 150: 64~71

Fang W F, Strobel H W. 1978. The drug and carcinogen metabolism system of rat colon microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.*, 186:128~138

Ged C, Umbenhauer D R, Bellew T M et al. 1988. Characterization of cDNAs, mRNAs, and proteins related to human liver microsomal cytochrome P450 (S)-mephenytoin 4'-hydroxylase. *Biochem.*, 27:6929

Ghazarian J G, Deluca H F. 1974. 25-hydroxylase: A specific requirement for NADPH and a hemoprotein component in kidney mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.*, 160:63~72

Ghersi-Egea J F, Minn A, Daval J L et al. 1989. NADPH: Cytochrome P-450(c) reductase: Biochemical characterization in rat brain and cultured neurons and evolution of activity during development. *Neurochem Res.*, 14(9):883~887

Goascogn C, Le P, Robel M, Gouezou N, Sananes E E, Baulieu and Waterman M. 1987. Neurosteroids: cytochrome P450scc in rat brain. *Sci.*, 237:1212~1215

Gonzalez F J. 1989. The molecular Biology of Cytochrome P450s. *Pharmacol Rev.*, 40:243~288

Graham-Lorence S. 1996. P450s: Structural similarities and functional differences. *FASEB J.*, 10: 206~214

Gray R, Boyle I, Deluca H F. 1971. Vitamin D metabolism: The role of kidney tissue. *Science*, 172:1232~1234

Guengerich F P. 1993. Metabolic reactions: Types of reactions of cytochrome P450 enzymes. In: J. B. Schenkman and H. Greim (eds). *Cytochrome P450* Springer-Verlag, 90~103

Guengerich F P, Mason P S. 1979. Immunological comparison of hepatic and extrahepatic cytochromes P-450. *Mol Pharmacol.*, 15(1):154~164

Guengerich F P, Brain W R, Sari MA et al. 1991. Expression of mammalian cytochrome P450 enzymes using yeast-based vectors. *Methods. Enzymol.*, 206:130~145

Guengerich F P, Dannan G A, Wright S T et al. 1982. Purification and characterization of liver microsomal cytochromes P450: electrophoretic, spectral, catalytic, and immunological properties and inducibility of eight isozymes isolated from rats treated with phenobarbital or  $\beta$ -naphthoflavone. *Biochemistry*, 21:6019

Hagihara K, Shiosaka S, Lee Y et al. 1990. Presence of sex difference of cytochrome P-450 in the rat preoptic area and hypothalamus with reference to coexistence with oxytocin. *Brain Res.*, 515,(1~2):69~78

Hall P M, Stupans I, Burgess W et al. 1989. Immunohistochemical localization of NADPH-cytochrome P450 reductase in human tissues. *Carcinogenesis*, 10:521

Hansson T, Tindberg N, Ingelman-Sundberg M et al. 1990. Regional distribution of ethanol-inducible cytochrome P450 IIIE1 in the rat central nervous system. *Neuroscience*, 34(2):451~463

Hassing J M, Turk W A, Stohs S J. 1989. Induction of intestinal microsomal enzymes by polycyclic aromatic hydrocarbons. *Gen. Pharmacol.*, 20:695

Hayashi S I, Nashiro M, Okuda K. 1984. Purification of cytochrome P450 catalyzing 25-hydroxylation of vitamin D3 from rat liver microsomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 121:994~1000

Hietanen E, Ahotupa M, Bereziat J C *et al.* 1987. Monoclonal antibody characterization of hepatic and extrahepatic cytochrome P450 activities in rats treated with phenobarbital or methylcholanthrene and fed various cholesterol diets. *Biochem. Pharmacol.*, 36:3973

Jakobsson S, Thor H, Orrenius S. 1970. Fatty acid inducible cytochrome P450 of rat kidney cortex microsomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 39:1073~1080

Kaminsky L S, Fasco M J. 1991. Small Intestinal Cytochromes P450 Crit. Rev. Toxicol., 21(6):407~422

Kapitulnik J, Gelboin H V, Guengerich F P *et al.* 1987. Immunohistochemical localization of cytochrome P450 in rat brain. *Neuroscience*, 20(3):829~833

Kawashima H, Strobel H W. 1995. cDNA cloning of a novel rat brain cytochrome P450 belonging to the CYP2D subfamily. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 209:535~540

Kawashima H, Strobel H W. 1995. cDNA cloning of three new forms of rat brain cytochrome P450 belonging to the CYP4F subfamily *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 217:1137~1144

Kim J C S, Fraser J M, Samsonoff W A *et al.* 1987. 2,2,2-Trifluoroethanol-induced enteropathy in rats: chemically or bacterially mediated effects. *Toxicol. Pathol.*, 15:388

Kimura S, Kozak C A, Gonzalez F J. 1989. Identification of a novel P450 expressed in rat lung: cDNA cloning and sequence, chromosome mapping and induction by 3-methylcholanthrene. *Biochem.*, 28:3798

Kitada M, Kamataki T, Itahashio K *et al.* 1987. P450 HFLa, a form of cytochrome P450 purified from human fetal livers, is the 16 $\alpha$ -hydroxylase of dehydroepiandrosterone 3-sulfate. *J. Biochem.*, 262:13534

Kohler C, Eriksson L G, Hansson T, M *et al.* 1988. Immunohistochemical localization of cytochrome P-450 in the rat brain. *Neurosci Lett.*, 84(2):109~114

Leo M A, Lasker J M, Raucy J L *et al.* 1989. Metabolism of retinal and retinoic acid by human liver cytochrome P450IIC8. *Arch. Biochem. Biophys.*, 269:305

Michnovicz J J, Hahn E F, Fishman J. 1987. 19-Hydroxylation and aromatization of androgens in the developing rat brain. *Endocrinology*, 121(4):1209~1214

Miners J O, Smith K J, Robson R A *et al.* 1988. Tolbutamide hydroxylation by human liver microsomes, *Biochem. Pharmacol.*, 37:1137

Miranda C L, Hendrson M C, Wang J L, Nakae H S. 1987. Synthesis and cytochrome P450 dependent monooxygenases in small intestine and liver of Japanese quail. *J. Toxicol. Environ. Health*, 20:27

Molowa D T, Schuetz E G, Wrighton S A *et al.* 1986. Complete cDNA sequence of a cytochrome P450 inducible by glucocorticoids in human liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 83:5311

Monostory K, Vereckey L. 1995. Role of human cytochrome P450 enzymes in the metabolism of xenobiotics. *Acta. Pharm. Hung.*, 65(5):147~156

Murray G I, Barnes T S, Sewell H F *et al.* 1988. The immunocytochrome localisation and distribution of cytochrome P450 in normal human hepatic and extrahepatic tissues with a monoclonal antibody to human cytochrome P450. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 25:465

Naslund B M, Glaumann H, Warner M *et al.* 1988. Cytochrome P-450 b and c in the rat brain and pituitary gland. *Mol. Pharmacol.*, 33(1):31~37

Nebert D W, Nelson D R, Coon M J *et al.* 1991. The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping and recommended nomenclature, *DNA Cell. Biol.*, 10:1~14

Nelson DR, Koymans L, Kamataki T *et al.* 1996. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics*, 6:1~42

Okita R T, Parkhill L K, Yasukochi Y *et al.* 1981. The  $\omega$ - and ( $\omega$ -1)-hydroxylase activities of prostaglandins A<sub>1</sub> and E<sub>1</sub> and Laurie acid by pig kidney microsomes and a purified kidney cytochrome P450. *J. Biol. Chem.*, 256:5962~5964

Pasanen M, Stenback F, Park S S *et al.* 1988. Immunohistochemical detection of human placental, cytochrome P450-asso-

ciated mono-oxygenase system inducible by maternal cigarette smoking. *Placenta*, 9:267

Peter R, Bocker R, Beaune P H *et al.* 1990. Hydroxylation of chlorzoxazone as a specific probe for human liver cytochrome P450IIIE1. *Chem. Res. Toxicol.*, 3:566

Quattrochi L C, Tukey R H. 1989. The human cytochrome CYP1A2 gene contains regulatory elements responsive to 3-methylcholanthrene. *Mol. Pharmacol.*, 36:66

Raucy J L, Lasker J M, Lieber C S *et al.* 1989. Acetaminophen activation by human liver cytochromes P450IIIE1 and P450IA2. *Arch. Biochem. Biophys.*, 271:270

Raunio H, Syngelma T, Pasanen M *et al.* 1988. Immunochemical and catalytical studies on hepatic coumarin 7-hydroxylase in man, rat and mouse. *Biochem. Pharmacol.*, 37:3889

Ravindranath V, Boyd M R. 1995. Xenobiotic metabolism in brain. *Drug Metab Rev.*, 27(3):419~448

Ravindranath V, Anandatheerthavarada H K and Shankar S K. 1989. Xenobiotic metabolism in human brainpresence of cytochrome P-450 and associated mono-oxygenases. *Brain Res.*, 496(1~2):331~335

Ravindranath V, Bhamre S, Bhagwat S V *et al.* 1995. Xenobiotic metabolism in brain. *Toxicol Lett.*, (82~83):633~638

Relling M V, Aoyama T, Gonzalez F J *et al.* 1989. Tolbutamide and mephenytoin hydroxylation by human cytochrome P450s in the CYP2C subfamily. *J. Pharm. Exp. Ther.*, 252:442

Roselli C E. 1991. Synergistic induction of aromatase activity in the rat brain by estradiol and 5 alphadihydrotestosterone. *Neuroendocrinology*, 53(1):79~84

Roselli C E. 1991. Sex differences in androgen receptors and aromatase activity in microdissected regions of the rat brain. *Endocrinology*, 128(3):1310~1316

Ryan D E, Levin W. 1990. Purification and characterization of hepatic microsomal cytochrome P450. *Pharmacol. Ther.*, 45:153

Samuelsson B. 1980. The leukotrienes: A new group of biologically active compounds including SRS-A. *Trends Pharmacol. Sci.*, 1:227~230

Sanghera M K, Simpson E R, McPhaul M J *et al.* 1991. Immunocytochemical distribution of aromatase cytochrome P450 in the rat brain using peptide-generated polyclonal antibodies. *Endocrinology*, 129(6):2834~2844

Sesardic D, Boobis A R, Murray B P *et al.* 1990. Furafylline is a potent and selective inhibitor of cytochrome P4501A2 in man. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 29:651

Sesardic D, Cole K J, Edwards R J *et al.* 1990. The inducibility and catalytic activity of cytochrome P450c (P450IA1) and P450d (P450IA2) in rat tissues. *Biochem. Pharmacol.*, 39:499

Shimada T, Misono K S, Guengerich F P. 1986. Human liver microsomal cytochrome P450 mephenytoin 4-hydroxylase, a prototype of genetic polymorphism in oxidative drug metabolism. *J. Biol. Chem.*, 261: 909

Simmons D L, Kasper C B. 1989. Quantitation of mRNAs specific for the mixed-function oxidase system in rat liver and extrahepatic tissues during development, *Arch. Biochem. Biophys.*, 271:10

Srivastava P K, Yun C H, Beaune P H *et al.* 1991. Separation of human liver microsomal tolbutamide hydrolase and (S)-mephenytoin 4-hydroxylase cytochrome P450 enzymes. *Mol. Pharmacol.*, 40:69

Strobel H W, Kawashima H, Geng J *et al.* 1995. Expression of multiple forms of brain cytochrome P450. *Toxicol Lett.*, 82~83:639~643

Stromstedt M, Warner M, Gustafsson JA. 1994. Cytochrome P450s of the 4A subfamily in the brain. *J Neurochem.* 63(2):671~676

Sundseth S S, Waxman D. 1992. Sex-dependent expression and clofibrate inducibility of cytochrome P450 4A fatty acid  $\omega$ -hydroxylases. *J. Biol. Chem.*, 267:3915~3921

Thompson E A Jr, Siiteri P K. 1974. The involvement of human placental microsomal cytochrome P450 in aromatization, *J. Biol. Chem.*, 249:5373~5378

Tinel M, Belghiti J, Descatoire V *et al.* 1987. Inactivation of human liver cytochrome P450 by the drug methoxsalen and other psoralen derivatives. *Biochem. Pharmacol.*, 36:951

Tyndale R F, Sunahara R, Inaba T *et al.* 1991. Neuronal cytochrome P450IID1 (debrisoquine/sparteine-type): Potent inhibition of activity by (-)-cocaine and nucleotide sequence identity to human hepatic P450 gene CYP2D6. *Mol Pharmacol.*, 40(1):63~68

Vernet A, Siess M H. 1986. Comparison of the effects of various flavonoids on ethoxycoumarin deethylase activity of rat intestinal and hepatic microsomes. *Food Chem. Toxicol.*, 24:857

Vistisen K, Loft S, Poulsen H E. 1991. Cytochrome P4501A2 activity in man by caffeine metabolism, effect of smoking broccoli and exercise in biological reactive intermediate IV: Molecular and cellular effects and their impact on human. *Health vol.* 283, Witmer C *et al.* New York: Plenum Press, 407

Volk B, Meyer R P, von Lintig F *et al.* 1995. Localization and characterization of cytochrome P450 in the brain. *In vivo* and *in vitro* investigations on phenytoin- and phenobarbital-inducible isoforms. *Toxicol Lett.*, 82~83:655~662

Wang H, Kawashima H, Strobel H W. 1996. cDNA cloning of a novel CYP3A from rat brain. *Biophys. Res. Commun.*, 221:157~162

Warner M, Gustafsson J A. 1994. Effect of ethanol on cytochrome P450 in the rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 91:1091~1023

Warner M, Gustafsson J A. 1995. Cytochrome P450 in the brain: neuroendocrine functions. *Front Neuroendocrinol.*, 16(3): 224~236

Warner M, Kohler C, Hansson T, Gustafsson J A. 1988. Regional distribution of cytochrome P-450 in the rat brain: spectral quantitation and contribution of P-450b, e, and P-450c, d. *J Neurochem.*, 50(4):1057~1065

Waxman D J, Lapenson D P, Aoyama T *et al.* 1991. Steroid hormone hydroxylase specificities of eleven cDNA-expressed human cytochrome P450s. *Arch. Biochem. Biophys.*, 290:160

Williams D E, Hale S E, Lkita R T *et al.* 1984. A Prostaglandin  $\omega$ -hydroxylase cytochrome P450 (P450<sub>PG</sub>) purified from lungs of pregnant rabbits. *J. Biol. Chem.*, 259: 4600~4608

Wrighton S A, Brain W R, Sari M A *et al.* 1990. Studies on the expression and metabolic capabilities of human liver cytochrome P450IIIA5 (HLP3). *Mol. Pharmacol.*, 38: 207

Wrighton S A, Campanile C, Thomas P E *et al.* 1986. Identification of a human liver cytochrome P450 homologous to the major isosafrole-inducible cytochrome P450 in the rat. *Mol. Pharmacol.*, 29:405

Wrighton S A, Molowa D T, Guzelian P S. 1988. Identification of a cytochrome P450 in human fetal liver related to glucocorticoid-inducible cytochrome P450HLP in the adult. *Biochem. Pharmacol.*, 37: 3053

Wrighton S A, Ring B J, Watkins P B, *et al.* 1989. Identification of a polymorphically expressed member of the human cytochrome P450III family. *Mol. Pharmacol.*, 36:97

Wrighton S A, Thomas P E, Molowa D T *et al.* 1986. Characterization of ethanol-inducible human liver N-nitrosodimethylamine demethylase. *Biochem.*, 25:6731

Wrighton S A, Thomas P E, Ryan D E *et al.* 1987. Purification and characterization of ethanol-inducible human hepatic cytochrome P450 HLj. *Arch. Biochem. Biophys.*, 258:292

Wrighton S A, Thomas P E, Willis P *et al.* 1987. Purification of a human liver cytochrome P450 immunochemically related to several cytochrome P450 purified from untreated rats. *J. Clin. Invest.*, 80:1017

Wyss A, Gustafsson J A, Warner M. 1995. Cytochromes P450 of the 2D subfamily in rat brain. *Mol Pharmacol.*, 47(6): 1148~1155

Yamano S, Nhamburo P T, Aoyama T *et al.* 1989. cDNA cloning and sequence and cDNA-directed expression of human P450 IIB1: identification of a normal and two variant cDNAs derived from the CYP2B locus on chromosome 19 and differential expression of the IIB mRNAs in human liver. *Biochemistry*, 28:7340

Yamano S, Tatsuno J, Gonzalez F J. 1990. The CYP2A3 gene product catalyzes coumarin 7-hydroxylation in human liver microsomes. *Biochem.*, 29:1322

Yang C S, Yoo J S H, Ishizaki H *et al.* 1990. Cytochrome P450IIE1: roles in nitrosamine metabolism and mechanisms of regulation. *Drug Metab. Rev.*, 22:147

Yasumori T, Murayama M, Uamazoe Y *et al.* 1989. Expression of a human P450IIC gene in yeast cells using galactose-ind

ducible expression system. *Mol. Pharmacol.*, 35:443

Yun C H, Shimada T, Guengerich F P. 1991. Purification and characterization of human liver microsomal cytochrome P4502A6. *Mol. Pharmacol.*, 40:679

Zanger U M, Vilbois F, Hardwick J *et al.* 1988. Absence of hepatic cytochrome P450bu1 cause genetically deficient debrisoquine oxidation in man. *Biochem.*, 27:5447

Zhou H H, Anthony L B, Wood A J J *et al.* 1990. Induction of polymorphic 4'-hydroxylation of S-mephenytoin by rifampicin. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 30:471.

Ortiz de Montellano P R, Reich N O. 1986. Inhibition of cytochrome P450: heme-binding site and heme reactivity, in *Cytochrome P450* Schenkman, JB and Griem H, (eds.). Berlin: Springer-Verlag, 169~181.

## 第六章 细胞色素 P450 与某些疾病的关系

严重的肝脏疾病会导致药物代谢障碍的发现已 40 年,但仅在近 10 年才开始对其中某些酶及其分子基础的变化进行研究。Farrell(1987)综述肝外疾病对药物代谢的影响时指出,除了从实验动物的研究结果类推外,对于哪种疾病能够改变肝脏药物代谢酶活性的知识所知甚少。此后,分子生物学的方法使研究者有可能对不同发病阶段药物代谢的变化进行详细而深入的研究,尤其是对炎症介质参与的感染以及内分泌功能紊乱。

本章主要讨论肝脏疾病中 CYP 表达的变化,也涉及其他方面的研究进展。有关的问题,如编码细胞色素 P450 的 CYP 基因表达的改变引起的某些疾病的临床变化也都将包括在内。

### 6.1 细胞色素 P450 对肝病的影响

#### 6.1.1 肝脏 P450 总体水平的变化

许多组织都表达 CYP 基因,但仅有肝脏的 P450 酶活性极高,在药物的清除中起重要的作用。因而,可以设想肝脏疾病会极大地损害肝功能,从而降低其药物代谢能力。早期对肝病患者药物清除功能的研究倾向于支持这说法,但仍不是很明确,因为在某些情况下,有些药物的清除并不降低(Nelson, 1964; Farrell *et al.*, 1978; Morgan and McLean, 1995)。此外,一些病生理因素如肝脏的药物释放(肝血流, 血浆蛋白的吸附), 肝脏的摄取功能, 供氧量以及胆汁的分泌都能改变肝硬化对药物的清除(Morgan and McLean, 1995)。但这些变化因素不能解释各种药物的代谢差异。

已观察到严重肝病患者肝脏 P450 总体水平及相关的酶活性低于正常水平(Farrell *et al.*, 1979a; Brodie *et al.*, 1981)。这些变化在很大程度上导致药物清除和肝脏解毒功能的障碍。P450 显然比 P450 还原酶或 II 相酶(如参与药物和甾体反应的葡萄糖醛酸基转移酶(glucuronyl transferases)、硫化酶(sulphatase)、N-乙酰转移酶(N-acetyl transferase)以及氨基酸转移酶(amino acid transferases)(Hoyumpa and Schenker, 1991)对肝脏疾病的影响更为敏感。完全由后一类酶催化的药物代谢功能可以维持到肝病晚期。实际上,有些研究发现肝硬化患者单位细胞内的葡萄糖醛酸基转移酶含量偏高(Debinski *et al.*, 1995),这说明人体可以通过补偿性的上调作用来抵消功能性肝细胞数目减少而引起的功能障碍。

人类 P450 表达的显著降低仅发现于严重的肝病患者。严重的肝脏病变包括进行性肝功衰竭和不可逆的肝硬化。但是,在可逆性肝硬化、胆汁瘀积(cholestasis)、中度和轻度肝炎、脂肪肝等疾病中,肝脏总体 P450 水平及相应酶的含量都在正常范围(Brodic *et al.*, 1981)。

肝硬化是慢性肝病的终结状态。其形态学特征是粗密的纤维组织结缔,以及被再生

结节破坏的肝脏组织结构。肝脏微循环的紊乱(肝窦周围组织纤维化或者毛细化)和继发性门静脉高压(这一过程将形成肝外或肝内旁路血流)会导致肝脏血流变化,由此造成的药物释放减少以及肝脏摄取功能的减弱阻碍了肝脏对药物的快速清除。其次,肝硬化还可形成扩散屏障从而减少肝脏的供氧量,氧是 P450 依赖的混合功能氧化酶的底物之一,由此也导致了体内药物代谢障碍( Morgan *et al.*, 1995; Hickey *et al.*, 1995, 1996)。

一般在直接测量肝微粒体的 P450 依赖药物氧化酶活性时,发现在肝硬化患者体内的活性降低。但在研究所观察到的变化时,多是利用肝移植患者的被置换的肝脏,它们都处于“极严重”或“不能救治”的状态,因而不能代表临床所见的大部分病例。

另一个必须考虑的问题是,肝脏 CYP 对于能改变其表达的药物因子或其他的环境因素的反应程度(表 6.1)。曾经有人提出“病肝”对转录调节因子对蛋白合成的影响不做出反应。除急性肝功衰竭外,几乎没有证据支持这一假说。相反,几项体内研究表明大多数硬化肝脏仍能对刺激药物代谢的多种物质作出反应,如利福平(rifampicin)、安体舒通(alactone) (Miguet *et al.*, 1980)、香烟等 (Joeres *et al.*, 1988; Coverdale *et al.*, 1995)。严重肝病患者肝脏总体 P450 水平的降低的原因尚不清楚,因为对 CYP 基因的上调作用仍然明显存在。对此可提出一种可能的解释,即:CYP 表达下降是由于补偿疾病所引起的肝脏酶量减少,导致基因调控机制的障碍。正如以下将要讨论的,各种 CYP 表达的具体变化支持了这一假说。

表 6.1 肝脏疾病中影响细胞色素 P450 表达的因素

疾病相关的因素	遗传或环境因素
疾病严重程度	药物遗传学
疾病的病生理类型,是否伴随胆汁瘀积	药物的酶诱导作用,如利福平,安体舒通
门脉系统旁路和相应的激素变化	吸烟
肝细胞的低分化状态	
其他疾病,如糖尿病(diabetes mellitus)	营养
细胞因子	

### 6.1.2 各种 CYP 表达的变化

早期对肝微粒体碎片的研究表明,不同 P450 底物的氧化速率呈现不均衡的变化(Iqbal *et al.*, 1990),这是不同肝脏疾病对各种 P450 蛋白或 CYP 基因的不同影响的结果(表 6.2)。mRNA 水平的改变表明这一变化通常发生在翻译前水平。但即便是肝功能衰竭的病人,某些 CYP 的表达也不受影响,并且在药物诱导下可以呈现超生理水平的表达。

#### 6.1.2.1 CYP1A

在人类肝硬化患者中,CYP1A2 mRNA 和 P450 1A 免疫活性蛋白的降低最为显著。三项独立的研究分别报道了这种变化(Guengerich and Turvey, 1991; Lown *et al.*, 1992;

George *et al.*, 1995a,b), 另一种变化由 P450 1A 催化的乙氧基试卤灵 O-脱乙基酶的减少 (Iqbal *et al.*, 1990; George *et al.*, 1995a)。P450 1A 的显著降低也许能够解释为什么严重肝病患者芳烃羟化酶活性比依赖 P450 3A 的乙基吗啡 N-脱甲基酶 (ethylmorphine N-demethylase) 活性降低更为显著 (Farrell *et al.*, 1979a)。各种类型的肝硬化患者的 CYP1A 表达都降低 (表 6.2)。

表 6.2 肝脏疾病对各种 P450 蛋白的影响<sup>a</sup>

肝硬化类型	P4501A2/%	P4502C/%	P4502E1/%	P4503A/%
肝细胞性肝硬化	29 <sup>b</sup>	57	81	25 <sup>b</sup>
胆汁瘀积	18 <sup>b</sup>	34 <sup>b</sup>	49 <sup>b</sup>	41

a: 各种 P450 蛋白水平用其与对照组平均值的相对百分比表示

b: 表示与对照组有显著差异 (George *et al.*, 1995a)

肝病中茶碱 (theophylline) (Colli *et al.*, 1988)、咖啡因 (Desmond *et al.*, 1980) 以及安替比林 (antipyrine) 代谢的显著变化反映了 CYP1A 表达减弱的重要性 (Farrell *et al.*, 1978)。尽管其他 P450 (尤其是 3A4, 2C8 和 2E1) 在某些情况下也参与反应, 但这些物质主要是 P450 1A 酶催化代谢的 (Tassaneyakul *et al.*, 1994; Zhang and Kaminsky, 1995; Sharer and Wrighton, 1996)。在进行性肝硬化如慢性病毒性肝病以及原发性胆性肝硬化 (primary biliary cirrhosis) 中, 咖啡因和安替比林的代谢减弱较早出现 (Williams and Farrell, 1989; Coverdale *et al.*, 1995)。因此, 检查肝脏对这些物质的清除可以定量描述肝功能并监测肝病的发展 (Farrell and Coverdale, 1998)。值得注意的是, 香烟可以在很大程度上诱导 P450 1A2 的表达 (Sesardic *et al.*, 1988)。安替比林 (Coverdale *et al.*, 1995)、咖啡因 (Joeres *et al.*, 1988) 的清除都表明这种诱导作用在肝硬化阶段仍然存在。

### 6.1.2.2 CYP2C

相对 CYP1A 而言, 这一类基因受肝病影响较小。因此, 肝硬化患者对一种 P450 2C9 的底物——甲糖宁 (tolbutamide) 的清除仍处于正常水平 (Nelson, 1964)。另一方面, 消旋的甲基妥英可以作为 CYP2C19 的探针, 这种酶对肝病非常敏感 (Adedoyin *et al.*, 1998)。Lown 等 (1992) 利用单克隆抗体发现少数病例中, P450 2C9 蛋白含量有微弱减少, 但 P450 2C8 含量不变。Guengerich 和 Turvey (1991) 用一种亚家族特异性抗体以及相应探针没有发现 P450 2C 蛋白的变化。George 等 (1995) 在“肝细胞性”肝病中 (如慢性肝炎) 也未发现明显变化。相反, 由于胆汁流动受阻 (如胆汁瘀积) 而导致肝硬化的患者体内 P4502C 蛋白含量明显降低。因此, 肝病的类型以及严重程度至少可以部分解释以上不同的研究结果。

### 6.1.2.3 CYP3A

在这一类基因中, CYP3A4 是肝脏含量最为丰富的 P450 (约 40%), 能够催化至少 50% 现用药物的氧化反应 (Guengerich *et al.*, 1998)。早期研究仅发现, 肝硬化患者的 CYP3A 表达与活性只有微弱变化, 甚至没有变化。例如, Guengerich 和 Turvey (1991) 发现人肝硬化中 P450 3A 蛋白呈现的减少趋势不显著, 但 Lown 等 (1992) 发现 CYP3A 活性

明显降低,而 3A 蛋白含量却没有明显变化。另一方面,药物动力学的研究已证实由 3A 蛋白代谢的药物如利多卡因 (lidocaine) (Huet and Villeneuve, 1983; Meyer-Wyss *et al.*, 1993)、硝苯地平 (Kleinbloesem *et al.*, 1986) 在肝硬化时代谢受阻。

在某些类型的肝硬化中(肝细胞性疾病),3A 蛋白以及 3A 蛋白催化的睾酮  $6\beta$ -羟化酶 (testosterone  $6\beta$ -hydroxylase) 的活性明显低于对照组。但是胆汁瘀积性肝硬化中,3A mRNA 以及蛋白的水平变化差异很大,但其平均值与对照组没有显著差异。有趣的是,在体外利用 CYP3A 的底物乙基吗啡和氨基比林来测量酶活性,却发现原发性胆性肝硬化和其他肝脏疾病中 CYP3A 活性都明显降低 (Farrell *et al.*, 1979a; Iqbal *et al.*, 1990)。

#### 6.1.2.4 CYP2E1

人类肝脏疾病中,CYP2E1 表达的差异也比较大。例如 Lown 等 (1992) 在 9 例晚期肝病中并未发现 CYP2E1 变化,但是,Guengerich 和 Turvey (1991) 发现 42 例肝硬化病人的 CYP2E1 平均水平显著低于对照组。Goerge 等 (1995a) 的研究认为 CYP2E1 的表达与疾病类型有关。与 CYP2C9 相似但与 CYP3A 相反的是,P450 2E1 蛋白及相应的酶活性在胆汁瘀积性肝硬化中明显降低,但在肝细胞性肝病中却保持正常水平。

在肝细胞性肝病中,CYP2E1 持续表达的可能原因之一是酒精和糖尿病的影响。众所周知,酒精可以诱导 CYP2E1 的表达,尤其是通过翻译后水平的调节 (Hu *et al.*, 1995; Lieber, 1997), 而糖尿病可在 mRNA 和蛋白水平提高 CYP2E1 的表达 (de Waziers *et al.*, 1995)。实际上,CYP2E1 表达增高很可能是酒精性肝硬化的致病因素之一 (Nanji and Zakim, 1996; Lieber, 1997)。由于供氧量减少,肝内组织处于缺氧状态。Weltman 等 (1998) 在营养性脂肪肝模型动物中以及非酒精性临床脂肪肝患者 (nonalcoholic steatohepatitis, NASH) 中也观察到 CYP2E1 表达增高,后者肥胖和高脂血症中尤为常见。早期研究发现 NASH 病人对安替比林的代谢减弱 (Fiatarone *et al.*, 1991)。有些体内研究结果也表明 NASH 患者 CYP2E1 活性增高 (Leclercq *et al.*, 1996)。

#### 6.1.2.5 其他 CYP

人肝脏疾病中其他 CYP 变化,在中度肝脏疾病中,脒基四氢异喹啉 (debrisoquin) 的代谢不发生改变,这表明 CYP2D6 对肝病影响有一定的耐受性 (Adedoyin *et al.*, 1998)。大鼠的同源蛋白 - CYP2D1 似乎也能够抵抗肝硬化的影响 [以心得安 (propranolol) 的羟化作用为指标] (Fenyves *et al.*, 1993)。可以反映体内 P450 2A6 的香豆素 7-羟化反应的活性也受到肝病的影响 (Sotaniemi *et al.*, 1995)。

关于人胎儿 CYP3A7, 目前仍不知道其作用底物的特异性。在成年人肝脏中,这个基因通常不表达,但有人认为它在某些肝细胞癌中表达。某些硬化肝脏能表达 CYP3A7 在 mRNA 水平,但尚没有关于其蛋白表达的报道。CYP3A7 的表达说明了肝细胞的低分化状态与  $\alpha$ -胎球蛋白呈负相关,从而可以作为癌前病变的指标之一,但对此仍需进一步的研究。

## 6.2 肝脏疾病中 CYP 表达变化机制

### 6.2.1 蛋白表达的变化

对肝病患者药物代谢酶活性降低提出了各种各样的解释,包括蛋白质合成障碍,酶的抑制或破坏,功能性肝细胞数量减少等,推断营养因素也可能改变酶活性(George *et al.*, 1996)。但是所有这些假说都不能很好地解释以上所述研究结果。此外,没有证据表明硬化的大鼠肝脏不能有选择性地合成 P450 蛋白(Farrell and Zaluzny, 1984)。

大鼠胆管结扎(BDL)可以引发严重的胆汁瘀积,并伴有肝细胞损伤。这与 P450 蛋白及 P450 还原酶的普遍降低有关,后者可能由于胆酸受去垢剂的作用而破坏,因为在体外用胆酸培育肝微粒体可以引起同样的变化(Chen and Farrell, 1996)。然而,没有其他证据表明肝硬化患者 P450 酶受到损伤(Farrell and Zaluzny, 1985),早期研究也未能发现可逆性酶抑制现象。另一方面,从病理学角度而言,功能性肝细胞数量的减少可以很好地解释患慢性肝病时药物代谢酶的变化,但却不能说明为什么 P450 酶比Ⅱ相酶或 P450 还原酶更易受影响(Hoyumpa and Schenker, 1991)。它同样不能解释各种 CYP 的变化的差异。

### 6.2.2 mRNA 水平的变化

人类移植肝脏 CYP 表达的研究清楚地表明了 P450 蛋白表达的改变至少在很大程度上反映了 CYP - 特异性 mRNA 的变化(表 6.3),在各种肝脏疾病中,CYP1A2 mRNA 水平显著降低,但 1A2 和 3A4 的转录水平大致与相应蛋白的变化平行(George *et al.*, 1995b)。在所有 P450 2C 蛋白中,CYP2C9 mRNA 的变化最为显著,这或许反映了前面所说的各种 CYP2C 基因表达的差异。在胆汁瘀积性肝硬化中,与相应的蛋白水平一致,CYP2E1 mRNA 水平明显降低,但在肝细胞性肝病中 P450 2E1 蛋白只是发生轻微的变化。因此,对于 CYP2E1 而言,mRNA 变化与对应蛋白含量的变化相关性不大,这很可能反映了翻译后水平的蛋白稳定性调节,即分子水平的酶诱导性蛋白调节(Hu *et al.*, 1995; Lieber, 1997)。

表 6.3 肝硬化时,CYP mRNA 与肝脏微粒体中蛋白的关系(George *et al.*, 1995a,b)

CYP	相关系数( $r_s$ )	P 值
1A2	0.74	< 0.0001
2C	0.36	< 0.01
2E1	0.43	< 0.001
3A	0.64	< 0.0001

### 6.2.3 肝硬化模型动物

肝病模型动物可用于研究改变 CYP 表达的各种病生理因素。潜在的相关因素包括

进行性肝纤维化,肝血窦毛细化(capillarization),门脉系统分流,肝组织再生以及胆汁瘀积(表 6.4)。肝细胞损伤,细胞因子以及内源性或外源性 CYP 诱导因子也可以影响 CYP 的表达(表 6.5)。早期研究中,Murray 和 Farrell(1984)利用底物结合光谱的间接方法,证明了反复用 CCl<sub>4</sub> 处理或仅用肝脏毒剂一次处理导致肝硬化的病鼠体内各种 CYP 的变化并不相同。随后的研究表明这与雄性特异的 CYP (2C11 和 4A2)表达降低有关(Murray *et al.*, 1987a,b)。这种变化类似于去雄性化(demasculinization),但应用雄激素不能逆转这种变化。

表 6.4 肝脏疾病中影响 P450 表达的病生理因素(Hasler *et al.*, 1999)

(1)肝细胞损伤,蛋白合成障碍	(5)门脉系统旁路形成
(2)肝细胞质量降低	(6)肝细胞再生(分化细胞呈低分化,高增殖状态)
(3)进行性肝脏纤维化	(7)胆汁瘀积
(4)肝血窦毛细血管化	(8)炎症,细胞因子

表 6.5 细胞因子对肝细胞 CYP 表达的影响(Hasler *et al.*, 1999)

细胞因子	CYP	物种/实验体系	变化	备注, 文献
TNF- $\alpha$	2C11, 3A2	大鼠(雄性)	mRNA 和蛋白下降	Nadin <i>et al.</i> , 1995
	1A, 2C11,	培养大鼠肝	mRNA 和蛋白下降	Chen <i>et al.</i> , 1995; Carlson and Billings 1996
	2B1/2, 3A2	细胞		
	1A, 3A4	培养人肝细胞	利福平的诱导受阻; 对 1A 作用最强; 1A1 结构基因表达减少	Muntane-Relat <i>et al.</i> , 1995
IL-1(IL-1 $\beta$ )	1A, 2C11, 2B1/2, 3A2	培养大鼠肝细胞	mRNA 和蛋白下降; 影响 CYP2C11 的转录	Chen <i>et al.</i> , 1995; Carlson and Billings 1996
IL-1 $\alpha$	1A, 3A4	培养人肝细胞	利福平的诱导受阻; 对 CYP 结构基因表达没有影响	Muntane-Relat <i>et al.</i> (1995)
IL-2	1A1, 2B, 2C 11, 2D1, 3A	培养大鼠肝细胞	蛋白含量减少, 2C11 和 3A2 的 mRNA 水平降低	IL-2 受体抗体和酪氨酸激酶抑制剂可阻断其下调作用; Tinell <i>et al.</i> (1995)
IL-4		培养人肝细胞	mRNA 水平降低, 影响 CYP2C11 的转录	Abdel-Razzak <i>et al.</i> (1993)
IL-6	2C11	培养大鼠肝细胞	利福平诱导阻断; 对 3A4 作用最强; 对 CYP 结构基因表达没有影响	Chen <i>et al.</i> (1995)
	3A4	培养人肝细胞		Muntane-Relat <i>et al.</i> (1995)
干扰素- $\alpha/\beta$	1A, 3A (可能)	人, 体内研究	安替比林, 茶碱, 氨基酸, 红霉素的代谢降低	
	3A2	雄性大鼠	3A2 蛋白及 mRNA 含量降低	Craig <i>et al.</i> (1990)
	1A, 2B1, 3A	小鼠	1A1, 2B1, 3A 蛋白含量降低	Carelli <i>et al.</i> (1996)
干扰素- $\gamma$	3A2, 3A23	大鼠; 培养大鼠肝细胞	3A2 蛋白及 3A2, 3A23 mRNA 含量降低, 苯巴比妥诱导阻断	Tapner <i>et al.</i> (1996)

Murray 等(1992)研究 CYP2C11 和 3A2 表达的降低与肝硬化发展阶段的关系发现,利用一种无胆碱(CD)、营养全面的饲料喂养实验动物,会导致脂肪肝和进行性的肝纤维化。在 25~30 周时,大多数实验动物都发生肝硬化,其形态变化类似于酒精性肝硬化或 NASH 性肝硬化。在喂饲上述饲料 6 周时,肝微粒体 P450 总体水平保持正常,但 10 周时,P450 含量降到对照组的 73%,这一变化在很大程度上归因于 CYP2C11 的表达减少。

同时, P450 3A2 蛋白的酶活性也降低了 50%, 其他 P450 的酶活性仅有轻微的变化, 此后 P450 2C11 蛋白一直维持在极低水平, 而其他 P450 蛋白仍没有明显变化。

在 6~10 周期间的关键变化在病理学的水平上来看, 10 周时肝纤维化早期表现较明显, 但不是在 6 周。门静脉压与对照组相比在 10 周时仅轻度增高, 到 25 周时, 变化仍不显著。10 周时最明显的是血清生化指标的变化, 尤其是血清中胆酸的变化 (Azer *et al.*, 1993), 这似乎是门脉系统分流的初期征兆, 随后则是肝血的毛细血管化 (Fenyves *et al.*, 1993; Gariepy *et al.*, 1993)。在 10 周时, 血清中雌二醇 (estradiol) 的浓度也显著增高, 但雄激素水平不变 (Murray *et al.*, 1992)。30 周时, 血清雄激素含量开始降低, 在肝硬化的雄性大鼠体内, 雄激素水平非常低。

由此可以得出结论, 喂食 CD 动物 10 周后肝脏开始纤维化, 导致门脉系统分流而使雌二醇在肝脏积累 (Farrell *et al.*, 1988)。雄性激素含量减少不能解释 10 周时 CYP2C11 的表达降低, 因为其血清含量尚未改变。但是, 雌二醇通过影响垂体生长激素分泌而导致雄性特异的 CYP 的下调作用 (Ho and Weissberger, 1990)。因此, 雌二醇使雄性生长激素的分泌从常规的脉冲式模式 (分泌脉冲间隔为 3~4 小时, 脉冲间隔期激素水平极低几乎不可测量) 转变为雌性分泌模式 (即较高的基础水平以及不明显的分泌峰)。应该指出的是: 生长激素的分泌模式是大鼠肝脏性别依赖性 CYP 表达的关键决定因素 (Waxman *et al.*, 1990, 1995; Robertson *et al.*, 1998)。

#### 6.2.4 门脉系统分流 (门脉旁路)

对一种门静脉旁路模型大鼠的研究 (门静脉结扎 PVL) (Cantrill *et al.*, 1989; Jiang *et al.*, 1994), 证明门脉系统分流是影响大鼠肝脏 CYP 表达的病生理因素。门静脉结扎后 P450 总体水平降低几乎完全是由于 CYP 2C11 和 3A2 表达减少所致 (Jiang *et al.*, 1994)。并且, 这种变化发生于翻译前水平, 因为相应的 mRNA 含量也降低, 其中 CYP2C11 mRNA 最终降至为零 (Jiang *et al.*, 1994)。PVL 还与血清中雄激素含量降低和雌激素水平增高有关, 这些变化与促性腺素量和促雄激素水平降低有关, 这表明中枢性 (下丘脑-垂体系统) 调控机制的存在 (Farrell *et al.*, 1986)。下丘脑切除的大鼠表现出类似的激素变化 (Zaphiropoulos *et al.*, 1989), 利用甲基睾酮 (methyl testosterone) 并不能使 PVL 大鼠 CYP2C11 表达的变化逆转 (Farrell *et al.*, 1986)。相关的研究表明门静脉旁路可以通过几种途径导致血清雌二醇含量增高 (Farrell *et al.*, 1988), 其中包括肝外性激素 (尤其是雄激素) 转化为雌二醇的途径 (Farrell and Koltai, 1988), 这主要是由于肝脏雄激素 16a-羟化反应以及使雌二醇变为雌三醇的 16a-羟化作用减弱所致 (Cantrill *et al.*, 1989)。

如果在 PVL 和肝硬化时, 主要是雌二醇介导了 CYP2C11 的下调作用, 那么可以预测 PVL 与雄性生长激素 (GH) 分泌模式的改变有关, 如果内源性 GH 分泌被抑制, CYP2C11 的持续性表达则是外源性 GH 补偿性作用的结果。尽管 PVL 确实通过提高 GH 的基础水平而改变了雄性的脉冲式分泌模式, 但是这方面的结论仍不是很明确。

### 6.2.5 肝脏再生

肝脏再生是肝硬化的另一致病因素,部分切除大鼠肝脏(PH)可刺激肝脏再生并使其CYP的表达发生变化(Ronis *et al.*, 1992)。早期研究(Fouts *et al.*, 1961)已注意到手术、麻醉、断食等非特异性作用可以使肝切除大鼠及假手术对照组大鼠中多种P450催化酶的活性暂时抑制(48h)。此后,雄性大鼠仅有雄性特异性CYP(2C11和3A2)受到抑制。免疫定量测定也证实了这一现象(Ronis *et al.*, 1992)。这些变化与血清中雌二醇含量增高以及睾酮降低有关(Liddle *et al.*, 1989)。在肝切除的病人中也观察同样的激素变化(Liddle, 1992, 但仍不清楚这些变化是否改变了临床肝病患者CYP的表达。Ronis等(1992)发现肝脏部分切除的雄性大鼠手术后生长激素的分泌受到暂时抑制,但并不确定这是否可以解释CYP2C11和3A表达的短暂变化(Liddle *et al.*, 1989)。

### 6.2.6 胆管结扎的大鼠

对胆管结扎大鼠(BDL)的研究也证明多种因素的复杂相互作用导致肝病CYP表达变化。胆道结扎可以引发严重的胆汁瘀积和肝细胞损伤,并与P450蛋白及P450还原酶的普遍降低有关,但这可能是由于胆酸的破坏性作用所致(Chen and Farrell, 1996)。除了普遍的非特异性的降低外,雄性特异的CYP(2C11和3A2)的降低尤其显著。表现之一就是雄性大鼠总体P450降低程度(50%)远大于雌性大鼠(30%)(Chen *et al.*, 1998),这可能因为CYP2C11和3A2转录减弱所致(Chen *et al.*, 1995)。

相反,胆管结扎雌性大鼠仍能在mRNA的蛋白水平持续表达CYP2C12和3A2(Chen *et al.*, 1998)。不同于前面讲述的其他模型动物,胆管结扎的雄性大鼠在胆管结扎后,仍能表达雌性特有的CYP2C12(在mRNA和蛋白水平),这一过程被称作雌性化。值得注意的是雌二醇的增加是两性大鼠胆管结扎后非常突出的激素变化,尽管雄性大鼠血清睾酮的含量也有所降低。除去雄性化(demasculinization)以外,雌二醇还能使雄性大鼠雌性化(feminization)(Chen *et al.*, 1998)。血浆性激素水平的变化及其对垂体生长激素分泌的影响,很可能在转录后水平改变了CYP2C11,3A2和2C12的表达。

由此可以总结肝病中P450表达的变化包括:破坏性作用引起的非特异性改变,内源性激素调节导致的CYP特异性下调作用,以及转录激活因子累积产生的上调作用。但是在实验动物中观察到的性别特异性CYP变化是否与人类变化一致仍需深入研究。不过,激素显然能在“结构基因”水平调节人类CYP的表达。

## 6.3 病毒感染、疫苗注射以及炎症因子对肝脏P450的影响

病毒感染、疫苗注射、卡介苗(BCG)接种以及细菌感染都可通过影响肝脏P450表达而使药物代谢发生障碍。Farrell等对此有详细的讨论(Farrell, 1987; Morgan, 1993; Shedlofsky *et al.*, 1994)。尽管在实验条件下,大鼠的感染性损伤与肝脏P450表达的降低有关(Muntane *et al.*, 1995),但仍不知道人体在非感染条件下以炎症扩散为特征的疾病中(如类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis)、结节病(sarcoidosis)和局限性回肠炎病

(crohn's disease)是否会发生相似的变化。

### 6.3.1 内毒素与肿瘤坏死因子- $\alpha$

内毒素(脂多糖 lipopolysaccharide)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ )、白细胞介素-1(IL-1)和白细胞介素-6(IL-6)都是 CYP 表达变化的可能介导因子(Shedlofsky *et al.*, 1987; Wright and Morgan, 1991; Chen *et al.*, 1992)。两次给自愿者注射内毒素就能显著降低安替比林、苯巴比妥和茶碱类药物的代谢,而这种变化与 TNT-2 和 IL-6 的大量释放呈平行关系(Shedlofsky *et al.*, 1994)。同样给大鼠注射内毒素可以在转录水平降低 CYP2C11 和 2C12 的表达(Morgan, 1989)。

TNF- $\alpha$  能在 mRNA 和蛋白水平使雄性大鼠 CYP2C11 和 3A 表达减少(Nadin *et al.*, 1995)。TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-6 可以下调培养大鼠肝细胞的 CYP1A、2C11、2B1/2、3A2 的表达(Chen *et al.*, 1995; Carlson and Billings, 1996)。还有研究表明 IL-1 和 IL-6 可与结构基因启动子内的 DNA 序列(5'端上游 200 个碱基处)相互作用从而影响 CYP2C11 的表达(Chen *et al.*, 1995)。

### 6.3.2 白细胞介素(interleukins)

除 IL-1 和 IL-6 外, IL-2 也可使培养大鼠肝细胞内多种 CYP 表达下降,其中包括 P450 1A1, 2B, 2C11, 2D1 和 3A(Tinel *et al.*, 1995)。P450 2C11 和 3A2 的 mRNA 水平也相应降低,加入 IL-2 受体抗体或酪氨酸激酶抑制剂——染料木素(genistein)可以阻止 IL-2 的下调作用,这为受体活化的信号转导系统参与调节提供了明确的证据(Tinel *et al.*, 1995)。

### 6.3.3 干扰素

干扰素是另一类可改变 CYP 表达的炎症性细胞因子。给病人服用  $\alpha$  和  $\beta$  干扰素可降低安替比林(Williams and Farrell, 1986; Israel *et al.*, 1993)、茶碱(theophylline)(Okuno *et al.*, 1993)、红霉素(erythromycin)(Craig *et al.*, 1993)、氨基比啉(amion-pyrine)(Horsmans *et al.*, 1994)及其他药物的代谢(Israel *et al.*, 1993)。啮齿类动物中,  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  干扰素可降低大鼠 CYP3A2 表达(Craig *et al.*, 1989, 1990)。对大鼠培养细胞的研究证实了 IFN- $\gamma$  可能通过受体与细胞直接作用从而导致降低 CYP3A 亚家族成员(3A2 和 3A23)的 mRNA 表达(Tapner *et al.*, 1996)。IFN- $\alpha$  不影响 CYP2C11 的表达(Tapner *et al.*, 1996)。其他研究还发现干扰素和其他细胞因子(IL-1 $\alpha$ , IL-4, IL-6)对体外培养的人肝细胞 CYP 表达有多种影响(Abde-Razzak *et al.*, 1993; Muntane-Relat *et al.*, 1995)。

至此,可以清楚地看出干扰素以及其他细胞因子(尤其是 TNF- $\alpha$ )可以通过改变基因的转录而影响 CYP 的表达。对参与 CYP 转录调控的干扰素受体信号系统的分子机制尚需进一步的研究。

### 6.3.4 对酶诱导作用的影响

干扰素也可以减弱某些 P450, 如 2B 和 3A 蛋白以及苯巴比妥的催化活性 (Carelli *et al.*, 1996; Tapner *et al.*, 1996), 3-甲基胆蒽诱导的 1A 蛋白酶活性和  $\beta$ -萘黄酮 (naphthoflavone) 的诱导作用 (Carelli *et al.*, 1996)。有报道氧化氮参与 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  对 CYP 的下调作用, 但不参与 IL-6 的下调作用 (Carlson and Billing, 1996)。Muntane-Relat 等 (1995) 对体外培养人肝细胞的研究证明 IL-6 可以减弱 P450 3A4 诱导作用, TNF- $\alpha$  则能阻碍 P450 1A 的诱导, TNF- $\alpha$  也可使 CYP1A 表达降低 50%, 但 IL-1 $\alpha$  和 IL-6 都不能改变 CYP 结构基因的表达。

了解 CYP 表达的改变, 对确定感染性疾病 (如 HIV/AIDS) 的药物治疗方案具有指导意义。应当注意的是药物相互作用引起的 CYP 表达或 P450 相关的药物代谢酶活性的变化比细胞因子的作用强。药物间相互作用将是 HIV/AIDS 治疗的主要问题 (Flexner, 1998)。特别是利福平 (一种抗霉菌的关键药物), 是 CYP3A4 的强诱导剂 (Muntane-Relat *et al.*, 1995), 同时服用利福平将加速蛋白酶抑制剂 (尤其是 indinavir 和 nelfinavir) 的代谢, 因此抗逆转录病毒的作用将减弱甚至丧失。同样, 蛋白酶抑制剂和其他 P450 3A4 底物 (ektoconazole, terfenadine, erythromycin 和 midazolam), 也可发生相互作用, 对此 Flexner 有详细的综述 (Flexner, 1998)。这种相互作用可能使血液中药物的含量增高, 因此两种蛋白酶抑制剂同时应用可以增加药效, 但同样可能导致药物毒性。炎症反应是由于药物和药物相互作用下调 CYP3A4 的表达, 还是由于干扰了 P450 3A4 的诱导所引起, 至今仍是一个疑问。

## 6.4 甲状腺疾病

70 年前就已发现甲状腺功能亢进或甲状腺功能低的病人对药物的敏感性发生改变 (Shenfield, 1981; Farrell, 1987)。这种变化包括药物代谢的改变以及非药物代谢的生理改变 (Shenfield, 1981)。对实验动物的研究表明甲状腺功能低下通常与肝脏 P450 及 P450 还原酶水平降低有关, 在切除甲状腺或下丘脑的实验大鼠中, 三碘四腺原氨酸 (T3) 可以刺激依赖 P450 的药物氧化作用 (Farrell, 1987)。有的研究还发现在甲状腺中毒时 (循环血量中 T3 含量过高), 安替比林 (antipyrine) 的代谢增强, 其半衰期缩短 40%, 甲状腺中毒纠正后, 药物清除也随之加快。甲状腺中毒也与使雌激素转化为儿茶酚雌激素的 2-羟化作用的增强有关 (Fishman *et al.*, 1965; Ruder *et al.*, 1971), 这个反应是由于 P4501A 和一种或几种 P450 3A 蛋白催化的 (Aoyama *et al.*, 1990)。但是, 所观察到的甲状腺机能亢进导致依赖 P450 的药物清除的变化并不能说明 P450 的普遍增高, 因为苯妥英 (phenytoin) (P450 2C18)、心得安 (propranolol) (P450 2D6) 以及华法林 (warfarin) (几种 P450) 的代谢并不改变 (Farrell, 1987), 但可的松的 6 $\beta$ -羟化作用 (反映 P450 3A4 的活性) 明显减弱 (Yamagi *et al.*, 1969)。相反, 甲状腺功能低下常常与 6 $\beta$ -羟化作用的加强和安替比林代谢障碍相关。

现在, 对体外培养人肝细胞 CYP 表达调控的研究可以部分解释循环血量中碘化甲

甲状腺氨酸(T3)浓度变化所导致的药物代谢改变(Liddle *et al.*, 1998)。甲状腺素被认为是 CYP3A4 的负调控因子,很可能在转录水平发生作用,同时又是 CYP1A2 的正调控因子。T3 的代谢与糖皮质激素和生长激素有复杂的相互作用。在体外,三种激素可以直接作用于肝细胞并调节 CYP3A4 的表达(Liddle *et al.*, 1998)。在疾病状态下,垂体激素和 T3 对糖皮质激素分泌及代谢的影响以及垂体激素对 T3 分泌的影响,将产生更为复杂的相互作用。

## 6.5 垂体疾病和生长激素治疗

生长激素(GH)和 T3 可以下调大鼠肝脏 CYP3A2 的表达(Waxman *et al.*, 1990), CYP 2C11, 2C13, 3A18 在雄性大鼠体内表达需要脉动地分泌生长激素和很低的水平(Pampori and Shapiro, 1996; Robertson *et al.*, 1998)。生长激素分泌不足的儿童,茶碱(theophylline)的清除降低,而咖啡因和异戊巴比妥(amobarbital)的代谢却增强(Levitsky *et al.*, 1989)。生长激素替代疗法可以扭转这种变化。生长激素缺乏的成年人表现为安替比林代谢障碍,利用重组生长激素替代治疗也可以使这种变化逆转(Cheung *et al.*, 1996)。

已有证明 GH 可以显著增加培养的人肝细胞 CYP3A4 的表达,这种上调作用发生在翻译前水平(Liddle *et al.*, 1998)。此外, GH 的诱导作用与地塞米松(dexamethasone)相当,后者是 P450 3A 酶的诱导剂。对于甲状腺功能紊乱未治疗时,垂体对碘化甲状腺氨基酸和糖皮质激素的释放及次级代谢作用,使得体内 CYP 表达的变化更为复杂。到目前为止,仍不能确定在 GH 正常状态下 GH 替代治疗是否改变了肝脏 CYP 的表达并影响药物代谢速率。

## 6.6 其他疾病

在许多疾病中,都发现患者药物代谢发生改变(Farrell, 1987)(表 6.6),这些疾病包括糖尿病、癌症、肺心病以及肾功能衰竭。有人提出 CYP 表达的个体差异,在某些尚不了解的疾病中如在高血压中起重要作用(Ghosh *et al.*, 1995)。通常在这些疾病中 CYP 表达的变化不如肝病、感染、炎症以及内分泌紊乱等典型。此外,在这些疾病及其他一些常见病(癫痫、哮喘、胃溃疡)中,治疗引起的药物代谢改变似乎比病理因素导致的代谢改变更为重要。

表 6.6 内分泌紊乱对肝脏药物代谢的影响

紊乱	观察	解释	文献
甲状腺中毒 (甲亢)	刺激安替比林的代谢; 雌激素的 2-羟化作用加强	CYP1A (或 2C9 和 3A4) 活性 增强 CYP 1A 和 3A	Farrell (1987) Fishman <i>et al.</i> (1965); Ruder <i>et al.</i> (1971); Aoyama <i>et al.</i> (1990)
	苯妥英, 心得安, 苯丙酮香豆 素的清除没有变化	CYP 2C18 2D1 没有变化	Farrell (1987)

续表

可的松的 $6\beta$ -羟化作用减弱	P450 3A4 活性降低	Yamagi <i>et al.</i> (1969)
甲状腺功能低下	安替比林代谢障碍	CYP1A (或 2C9 和 3A4) 活性减弱
	可的松的 $6\beta$ -羟化作用加强	CYP 3A4 活性增高
生长激素不足	茶碱的清除减弱	CYP 1A 和/或 3A4 活性减弱, 1A, 2B, 3A 活性增强
生长激素替代疗法的纠正作用	咖啡因和异戊巴比妥的代谢增强	CYP1A (或 2C9 和 3A4) 活性
	安替比林代谢减弱	减弱

## 6.7 细胞色素 P450 和癌症

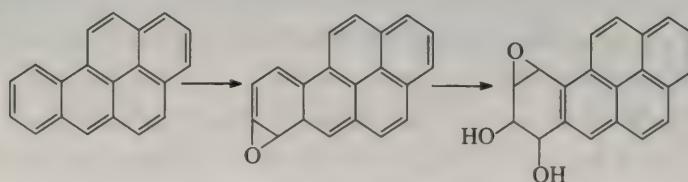
细胞色素 P450(CYP)有广泛的作用底物,因而它们在致癌化合物的代谢方面起着很重要的作用。大多数化学致癌物——无论是外源性的还是内源性的(如甾体激素)都需经生物转化激活,CYP 在这种生物激活中起重要的作用。CYP 也是抗癌药物的生物转化因子,能够增强或减弱药物的疗效。在种群内,有的 CYP 具有几种基因型,其相应的表型对致癌物或者抗癌药物敏感性不同。肿瘤组织和正常组织 CYP 表达的差异为抗癌药物选择性地作用于机体提供了依据,使药物作用局限于肿瘤组织。

### 6.7.1 致癌物质的生物活化

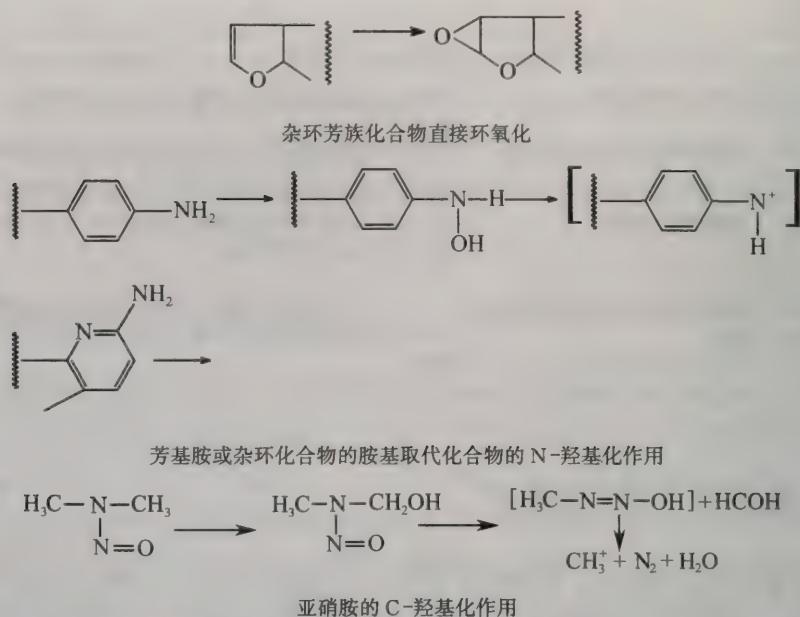
实验动物的研究表明 CYP 可以激活外源性致癌物(Guengerich, 1988a; Kawajiri and Fujii-Kuriyama, 1991)。此外,在模型动物中,某些内源性激素经由 CYP 催化转变成致癌物。因此可以推测,人类 CYP 超家族的成员参与外源性或内源性致癌物前体的生物激活作用(Nedelcheva and Gut, 1994; Guengerich, 1991)。

#### 6.7.1.1 外源性致癌物

借助于一些体外系统,对人类 CYP 激活几类外源性致癌物的能力进行了研究(图 6.1),主要是确定哪种 CYP 参与激活致癌物前体。利用体外检测系统已确定了某些活化的致癌物前体的致突变能力(Guengerich *et al.*, 1996)。其他的一些代谢步骤(包括环氧化物水化酶对环氧化物中间代谢物的水解作用或者 II 相蛋白的偶联反应)对于最终决定外源物质呈现正或负的致癌效果有重要作用。



多环芳烃化合物的两步环氧化

图 6.1 细胞色素 P450 催化致癌物前体的生物活化作用(Hasler *et al.*, 1999)

早期对啮齿类动物的研究表明苯并芘首先被 CYP1A1 环氧化,然后由环氧水解酶(epoxide hydrolase)形成相应致癌物前体——二羟基化合物(二氢二醇 dihydrodiol),最终再一次被 CYP1A1 氧化形成致癌物——二醇环氧化物(diolepxide)。

苯并芘的 7,8-二羟基代谢物是由人类 CYP1A1 催化的。前者在肝脏中进一步代谢产生致畸反应并生成 DNA 加合物。7,8-二羟代谢物的致畸能力与肝脏制备物中 CYP3A4 的水平有关(Shimada *et al.*, 1989a,b)。抗 CYP3A4 抗体可以阻断致畸作用,而加入纯化的人 CYP3A4 或者人类肝脏微粒体组织可以恢复致畸作用(Shimada *et al.*, 1989b, 1992)。由此可见,在肝脏或肺中,苯并芘从致癌物前体转化为致癌物是由 CYP3A4 催化的。致癌物前体苯并荧蒽(Benzo[b]fluoranthene)和 7,12-二甲基苯并荧蒽(dimethyl-benz[a]anthracene)也发生相似的反应。这表明人与啮齿类动物参与 PAH 生物活化的 CYP 有所不同。与此相反的是,在人类的肝外组织中,主要由 CYP1A1 参与激活 7,8-二羟基苯并芘(Quan *et al.*, 1994)。

二苯并(a,h)蒽(Dibenzo[a,h]anthracene)是一种强致癌性的多环芳烃类化合物,它需要经过生物激活后方能致癌。通过对一系列人类重组 CYP(不包括 CYP1A1)的研究发现 CYP1A2 和 2C9 最为活跃,CYP2B6 表现中度催化活性(Shou *et al.*, 1996b)。CYP2C9 在致癌物前体 3,4-二羟醇的形成中最为活跃,但 CYP1A2 和 CYP2B6 也起了一定的作用。对多环芳烃二苯并芘(dibenzo[a,l]pyrene)的研究发现 CYP2C9, 1A1, 2B6 共同作用形成致癌物前体 11,12-二氢二醇(11,12-dihydrodiol)。但是,CYP1A1 也参与了反应,而且其活性比 CYP2C9 高出 4 倍(Shou *et al.*, 1996a)。

Shimada 等(1996)报道了人类 CYP1 家族成员 1A1, 1A2 和 1B1 对 27 种多环芳烃及其代谢物的生物活化作用。CYP1B1 对苯并芘-4,5-二醇(benzo[a]pyrene 4,5-diol); (+) 苯并芘(a)7,8-二醇(benzo[a]opyrene-7,8-diol); 二苯并芘(a,1)11,12-二醇

(dibenzo[*a,l*]pyrene-11,12-diol); 芬并蒽-1,2-二醇(benzo[*a*]anthracene-1,2-diol)和芬并蒽顺式-5,6-二醇; 7,12-二甲基芬并蒽3,4-二醇(7,12-dimethylbenz[*a*]anthracene-3,4-diol); 芬并菲-3,4-二醇(benzo[*c*]phenanthrene-3,4-diol); 芬蒽-2,3-二醇(fluoranthrene-2,3-diol); 屈-1,2-二醇(chrysene-1,2-diol); 5-甲基屈-1,2-二醇(5-methylchrysene-1,2-diol); 5,6-二甲基屈-1,2-二醇(5,6-dimethylchrysene-1,2-diol); 芬并屈-11,12-二醇(benzo[*g*]chrysene-11,12-diol)最有效。CYP1A1 仅有选择性激活芬并芘7,8-二醇((-)benzo[*a*]pyrene-7,8-diol); 芬并芬蒽-9,10-二醇(benzo[*b*]fluoranthene-9,10-diol)。CYP1A2 对所检测的多环芳烃化合物不表现出选择性。

CYP1A1 对 7,12-二甲基芬并蒽(7,12-dimethylbenz[*a*]anthracene)的代谢最为活跃, 但 CYP1A2 和 2C9 也表现一定的催化活性。不同的 CYP 催化生成不同的代谢产物。CYP1A1 催化生成 5,6-二醇, 大部分 CYP 选择性地作用于 7 位甲基, 而 CYP1A1 则选择性地羟化 12 位甲基(Shou *et al.*, 1996a)。

由于肝外组织激活多环芳烃需要 CYP 酶的参与, 包括 CYP1A1, 1B1, 环氧化物水化酶, 依赖 NADPH 还原酶, 利用逆转录酶-聚合酶链反应(RT-PCR)可以测定支气管上皮细胞的相应 mRNA 的含量。吸烟者细胞内 CYP1A1 mRNA 含量比 CYP1B1 mRNA 高 6 倍, 但不吸烟人群中仅有 10% 的人表现类似的结果。其他酶的 mRNA 水平在吸烟者和不吸烟者中没有明显的差异。mRNA 水平的个体差异可以反映相应酶水平的变化, 以及机体对支气管癌易感性的不同。多环芳烃首先由 CYP1A1 和/或 1B1 催化形成中间产物, 然后由多种 CYP(包括 CYP1A1, 1B1, 3A4, 1A2, 2B6 和 2C9)催化产生最终的致癌物——二醇环氧化物。

黄曲霉素(aflatoxin B<sub>1</sub>)是一种外源性致癌物, 只经一次环氧化作用就可被激活。它转化为致癌物必须经过 8-9-外环氧化物(8,9-exo-epoxide), 但是主要参与活化的 CYP 还不是很清楚。有研究表明 CYP3A4 和/或 CYP1A2 都参与反应(Hashimoto *et al.*, 1995a; Ueng *et al.*, 1997; Langouet *et al.*, 1995)。在人体肺组织, 活化黄曲霉 B<sub>1</sub> 环氧化物的形成与 CYP3A4 的底物——硝苯地平(nifedipine)的代谢速率无关, 但是抗 CYP3A 抗体可以抑制其形成。由此可推断 CYP3A4 参与人体肺中黄曲霉 B<sub>1</sub> 的生物激活。

芳香胺类化合物先经 CYP 催化的 N-羟化作用, 随后生成具有反应活性的硝𬭩离子(nitronium ions)(图 6.1), 最终被活化为致癌物。人体肝微粒体已被证明能够催化 2-氨基芴(2-aminofluorene)和 2-萘胺(2-naphthylamine)的 N-羟化作用, 但不能催化 1-萘胺(1-naphthylamine)。前两种芳香胺是致癌物, 1-萘胺不是, 这些研究说明了 N-羟化反应产物的致癌作用(Hammons *et al.*, 1985)。早期的研究表明 CYP1A2 可以催化 2-氨基蒽的 N-羟化作用(Shimada and Okuda, 1988)。6-氨基屈(6-aminochrysene)有两条生物激活途径——CYP3A4 和 2B6 催化的 N-羟化途径以及 CYP1A2, 1A1, 1B1 或 CYP3A4 催化形成 1,2-二氢二醛(1,2-dihydrodial)的氧化途径(Yamazaki *et al.*, 1994; Shimada *et al.*, 1994a; Shimada *et al.*, 1996)。在某些还原性代谢中由相应的硝胺生成芳香胺, CYP 也具有一定的作用(Chae *et al.*, 1993)。通过比较一系列芳香胺的生物激活作用, 发现 CYP1B1 对 2-氨基蒽(2-aminoanthracene), CYP1A1 对 4-氨基联苯(4-amino-biphenyl)和 6-氨基屈, CYP1A 对 2-氨基芴(2-aminofluorene)分别具有最强的催化活性(Shimada *et al.*, 1996)。

另一类致癌物杂环胺类(heterocyclic amines)也是通过 CYP 催化的 N-羟化反应激活。CYP1 家族中的 1A1, 1A2 和 1B1 主要与生物激活作用相关, 但 CYP3A4 和 3A5 也有一定作用。由于 CYP1A 主要参与杂环胺的生物活化, 而它在消化道的含量几乎微不可查, 如果这些物质与大肠癌有关的话, 那么其生物活化必然首先发生在肝脏, 其后的反应则可能在大肠中进行。CYP1A1、1A2、1B1、3A4、2B5 都能使芳香胺生成 N-羟化产物, 它们的参与使活化反应具有组织特异性——CYP1A2 在肝脏表达, 而 CYP1A1 和 1B1 则在肝外表达。

经对 30 多种动物的研究已确定将近 300 种 N-亚硝胺类化合物(N-nitrosamines)具有致癌作用。人类广泛接触这类化合物以及 CYP 对 N-亚硝胺的代谢激活作用引起了人们对这类物质致癌作用的忧虑。CYP 使 N-硝基邻位的碳原子发生羟化作用产生致癌前体, 后者再转变成具有致癌活性的碳离子(carbonium ion)(图 6.1)(Haslar *et al.*, 1999)。

早期对 N-亚硝胺的乙基、甲基、丁基、苯基衍生物的研究表明, CYP2E1 主要参与它们激活作用(Guengerich, 1990b)。利用食道微粒体检验香烟中三种潜在的致癌物:N-硝基去甲烟碱(N-nitrosonornicotine NNN), 4-甲基尼古酰基-1-吡啶基-1-丁酮(4-methyl-nitrosamino-1-pyridyl-1-butanone, NNK)和 N-亚硝基二甲胺(N-nitrosodimethylamine, NDMA)的生物活化作用。研究发现 NNN 可以被所有的微粒体样品激活, NNK 却不能被大多数样品活化。利用抑制剂确定 CYP3A4 和 2E1 分别参与 NNN 和 NDMA 的激活, CYP1 亚家族的成员不能够活化 NDMA(Shimada *et al.*, 1996)。此后, 利用人肝微粒体的研究确定 CYP2A6 和 CYP3A4 能分别激活 NNN 和 NNK(Staretz *et al.*, 1997)。人体内 N-尼古酰胺的生物激活是由 CYP2E1, 3A4, 和 2A6 催化的, 在其他致癌物的生物活化中起重要作用的 CYP1 家族蛋白并不参与尼古酰胺的代谢。

杂环芳香胺是另一类环境致突变剂和由 CYP 活化的致癌物质, 其生物激活过程包括氨基的 N-羟化作用, O-乙酰基或 O-硫酰基以及芳基硝𬭩离子(arylnitronium ion)的生成。早期研究证明人肝微粒体 CYP 能活化几种杂环芳香胺, 包括鱼、肉的热解产物以及香烟, 这些致癌物包括 2-氨基-3,5-二咪唑(4,5-f)喹啉(2-amino-3,5-dimethyl imidazo(4,5-f)quinoline)(MeIQ); 2-氨基-3,5-二甲基咪唑(4,5-f)喹啉(2-amino-3-methylimidazo(4,5-f)quinoline)(IQ); 2-氨基-3,8-二甲基-咪唑(4,5-f)喹啉(2-amino-3,8-dimethyl-imidazo(4,5-f)quinoxaline)(MeIQx)。CYP1A2 参与这些物质及某些氨基吲哚和咪唑的生物活化(Shimada *et al.*, 1989a)。对以上物质, CYP1A2 的生物激活效率高于 CYP1A1, 但是对 3-氨基-1,4-二甲基-5H 吡啶并(4,3-b)吲哚(3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido(4,3-b)indole)和 3-甲基-4 氨基偶氮苯(3-methyl-4-aminoazobenzene), CYP1A1 则更有效(Shimada *et al.*, 1994)。在所检测的杂环芳香胺中, CYP1B1 对 3-氨基-1,4-二甲基-5H-吡啶并(4,3-b)吲哚(3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido(4,3-b)indole)的催化活性高于 CYP1A2(Shimada *et al.*, 1996)。人类胎盘蛋白 CYP3A7 在 N-乙酰转移酶-2(N-acetyltransferase-2, NAT-2)存在时, 可以有限地激活 IQ, MeIQX 和 MeIQ(Hashimoto *et al.*, 1995b)。CYP2C10 被认为在主要由 CYP1A2 催化的 2-氨基-卟啉(2-amino-carboline)生物活化中起辅助作用(Raza *et al.*, 1996)。杂环芳香胺这一类致癌物是由 CYP1 家族活化的, 其中如人 CYP1A2 对焦化的物质如蛋白质和碳水化合物生成

杂环芳香胺而致癌,其他 CYP 也具有一定作用。

#### 6.7.1.2 内源性化合物

最常见与癌症有关的内源性化合物是天然雌激素-17 $\beta$ -雌二醇(17 $\beta$ -estradiol)。两种 CYP 催化的雌激素代谢产物被认为具有致癌作用,雌二醇的 16 $\alpha$ -羟化作用产物——雌酮,可以与 DNA 共价结合(Osborne *et al.*, 1993)并促进一种变异产物表型的表达。雌激素的 4-羟基代谢产物由于能够参与代谢性氧还循环,而与乳腺癌的发病有关(Liehr *et al.*, 1990; Yager and Liehr, 1996)。有报道雌酮的 16 $\alpha$ -羟化作用是由 CYP3A4 和 3A5 催化的(Huang *et al.*, 1998)。雌激素的 4-羟化作用则由 CYP1B1 催化(Hayes *et al.*, 1996)。因此由不同 CYP 催化的两种代谢途径都可能与乳腺癌发病有关。

### 6.7.2 对癌症的易感性

CYP 具外源性致癌物和内源性激素的生物活化作用以及人类种群 CYP 的多态性使人们提出如下假说:致癌物敏感性存在个体间差异。许多实验研究了 CYP 多态性与“易感性”的关系。研究结果表明二者有联系,但不能证明偶然或短暂接触外源性致癌物与 CYP 多态性和疾病之间的关系。只有通过今后对某些病例或癌变前损伤,以及疾病发展情况进行深入的研究才有可能明确地区分“癌症易感”表型。

#### 6.7.2.1 肺癌

肺癌的发病具有家族性,并与接触香烟中的致癌物质密切相关。人体肺能激活吸入的香烟中芳烃化合物和芳香胺。

##### (1) CYP 1A1

Kellerman 等, (1973)对 CYP1A1 的基因型与肺癌的易感性作了广泛的流行病学对照研究,于 20 世纪 70 年代首次报道了 CYP 酶活性的高诱导性与肺癌发病的关系。芳烃羟化酶(aryl hydrocarbon hydroxylase, AHH), CYP1A1 催化活性以及体外培养淋巴细胞接触 3-甲胆蒽(3-methylcholanthrene)与研究对象的肺及肺外癌症发病的关系。肺癌组有 30% 患者表现为中等或高度 CYP1A1 诱导活性,而健康对照组仅有 9%。非肺源性癌症患者 AHH 诱导活性与普通人群相同,这表明 AHH 与肺癌的特异相关性,但不能排除吸烟对肺癌的影响。

肺癌患者的肺组织中 AHH 活性偏高(与近期开始吸烟的非肺源性癌症患者相比)(Petruzelli *et al.*, 1988)。高水平的 AHH 与高水平的肺 DNA 加合物有关(Petruzelli *et al.*, 1988; Bartsch *et al.*, 1993)。尽管所有的资料都是一种横向比较,而且可能与时序效应相混淆(如肺癌或相关的疾病状态可以直接或间接增加淋巴细胞的酶诱导活性),但对非人灵长类(Kouri *et al.*, 1980)和实验动物(鼠类)(Kouri *et al.*, 1982)的研究发现,AHH 诱导活性的增高是与致癌物诱发的肺癌易感性增加相关的。

目前已报道了几种 CYP1A1 的等位基因多态型。第一个是 CYP1A1 基因 DNA 序列上第 6235 位的 T 转变为 C,从而为 MspI 提供了一个新的限制性内切酶作用位点(Kawajiri *et al.*, 1990),这种替换发生在 CYP1A1 结构基因第 7 个外显子的下游的 3' 端

非编码区。非编码区置换的代谢性后果到现在还不清楚,尽管有一些证据说明淋巴细胞乙氧基试卤灵 O-去乙基酶(ethoxyresorufin O-deethylase)的活性增高,但是相应的 mRNA 的含量并不增加(Landi *et al.*, 1994; Petersen *et al.*, 1991; Crofts *et al.*, 1994)。日本肺癌患者中,这种等位基因的频率比欧洲人高,肺癌患者通过遗传获得 MspI 变异型的机率比正常人群高(Kawajiri *et al.*, 1990; Hayashi *et al.*, 1992)。在非亚裔人群中,二者表现为负相关性(Sugimura *et al.*, 1994; Hirvonen *et al.*, 1992; Drakoulis *et al.*, 1994; Shields *et al.*, 1993b; Tefre *et al.*, 1991; Xu *et al.*, 1996)。

第二个多态型是 CYP1A1 基因 7 号外显子的 4889 位的 A 转变为 G,使 CYP1A1 蛋白靠近血红蛋白结合区域的第 462 位氨基酸残基从 Ile 变为 Val,这显然与 MspI 限制性内切位点多态有关。当编码 Ile CYP1A1(普通型)或者 Val CYP1A1(稀有型)的 cDNA 被转导到酵母表达系统中时,Val 变异型 CYP1A1 表现更高的 AHH 活性和苯并芘致畸能力(Kawajiri *et al.*, 1993)。在有丝分裂剂刺激的淋巴细胞体系中,也得到类似的结果(Crofts *et al.*, 1994)。但是,另外一些研究表明,Val 突变型的代谢酶活性并不增强(Zhang *et al.*, 1996; Persson *et al.*, 1997)。CYP1A1 的 7 号外显子多态型(Val/Val)与人类肺组织 PAH-DNA 加合物含量增高并没有明确的相关性(Shields *et al.*, 1993a; Pastorelli *et al.*, 1998)。在日本人中,这种多态型与肿瘤 P53 的突变率增高有关(Kawajiri *et al.*, 1996)。日本的肺癌患者中淋巴细胞为 Val/Val 纯合子的比率比健康人群或非肺癌对照组高 2~3 倍(Kawajiri *et al.*, 1993)。亚裔人种群该等位基因频率并不同,但基因型与疾病的关系是稳定的(Sugimura *et al.*, 1998)。有三份关于 Ile-Val 多态的报道指出非亚裔人种群基因频率较低,约 3%~16%,而日本人则为 30% (Hirvonen *et al.*, 1992; Drakoulis *et al.*, 1994; Hamada *et al.*, 1995)。巴西肺癌患者 Val/Val 纯合子频率比对照组高 2 倍(Hamada *et al.*, 1995)。在德国人中这种差异更明显(Drakoulis *et al.*, 1994),但在芬兰人中没有发现肺癌患者 Val/Val 基因型频率增高(Hirvonen *et al.*, 1992)。

CYP1A1 多态与其他易感性多态基因的(如谷胱甘肽 S-转移酶-M1(GSTM1))共同作用比单独一种多态作用与肺癌的关系更为密切。I 相和 II 相组合基因型(CYP1A1 Val/Val 和 GSTM1 null)可能是日本人群中的肺癌易感基因型,因为肺癌患者中这种基因型的比率高达 27% (Nakachi *et al.*, 1993; Kihara *et al.*, 1995)。

总之,CYP1A1 多态变异型使致癌物质前体生物活化作用增强,并导致肺癌易感性增加这一假说在生物学上是合理的。有证据表明日本肺癌患者中,CYP1A1Val/Val 纯合子比健康人群或非肺癌对照组更为普遍,但欧洲人、美国人和非亚裔人群并未发现这种现象。有研究发现在非亚裔人群中,肺癌与外周血淋巴细胞 AHH 诱导活性增高有明显的关系,但是,并没发现肺癌与 MspI 或 Ile(Val)之间有一致关系。有可能现在确定的多态类型仅是影响 CYP1A1 诱导活性的部分原因。因此,在研究 CYP1A1 活性增强对肺癌的致病作用时,还应考虑流行病学的相关资料(Hasler *et al.*, 1999)。

## (2) CYP2D6

P450 不同的同工酶多态性变异数体的分布与癌症之间的关系引起人们的重视,其中 CYP2D6 的遗传多态性的毒理学重要性近年来已引起广泛的研究(Coutts and Urichuk, 1999)。

生物体对一种外源物——咪基四氢异喹啉(debrisoquine, 抗高血压药物)代谢的能力与肺癌的发病风险有关。CYP2D6 催化咪基四氢异喹啉的 4-羟化作用, 而其代谢表型是不可诱导的(Gonzalez and Gelboin, 1994)。代谢表型的种族差异是很明显的: 7% 的高加索人是弱代谢者(poor metabolizers, PM), 而东亚人的比率则为 1%。

咪基四氢异喹啉代谢表型与肺癌的关系也难确定, 因为 CYP 负责它的代谢。CYP2D6 主要在肝脏表达, 肺组织中 CYP2D6 蛋白和 mRNA 的含量都很低(Huang 等, 1998)。已有证明肝和肺微粒体的 CYP2D6 能够激活 4-甲基硝胺-1-(3-吡啶基)-1-丁醇酮(4-methylnitrosamine-1-(3-pyridyl)-1-butanone(NNK), 一种致癌的烟草衍生物), 但是哪一种特异 CYP 参与催化的仍不能确定。

对比吸烟者中肺癌患者和非癌症对照人群发现咪基四氢异喹啉弱代谢者表型(Caporaso *et al.*, 1990; Agundez *et al.*, 1994; Bouchardy *et al.*, 1996)。在有关资料进行分析中发现 2.3% 的肺癌患者是中度或强代谢(EM)表型(Amos *et al.*, 1992)。芬兰的一项研究报道肺癌患者 EM 基因型与正常人群的差值为 6.4( $p = 0.05$ )(Hirvonen *et al.*, 1993a)。CYP2D6C 等位基因编码的活性酶与其主要表型相比, 具有较低的  $K_m$  和较高的  $V_{max}$  值(Agundez *et al.*, 1994; Tyndale *et al.*, 1991; Broly *et al.*, 1991)。这种等位基因在西班牙肺癌患者中的频率比正常人群高 6 倍。但是, 对法国人群的研究却没有发现这种基因型与肺癌之间的关系有统计学的意义(Stucker *et al.*, 1995)。在几项对照研究中, 也没有发现咪基四氢异喹啉代谢表型与肺癌的必然联系(Rannug *et al.*, 1995; Benitez *et al.*, 1991; Duche *et al.*, 1991; Stucker *et al.*, 1995; Shaw *et al.*, 1995; Caporaso *et al.*, 1992)。一个引起混乱的因素可能是种族, 如高加索人的情形就不能外推至非洲裔的美国人(Ingelman-Sundberg *et al.*, 1992)或者亚洲人(Bertilsson *et al.*, 1992)。

总之, 关于 CYP2D6 基因型、表型以及肺癌关系的资料仍然有相互矛盾之处, 而且缺乏说服力。从生物学角度而言, EM 基因型是能够更有效地激活 NNK 等香烟中的 N-亚硝基化合物。但是关于基因在肺这一靶器官中的表达的各种报道, 使得 CYP2D6-肺癌假说仍存有争议(Hasler *et al.*, 1999)。

### (3) CYP2E1

CYP2E1 在人类肝、肺、肾脏中表达, 并能被酒精诱导。它与肝脏的脂肪过氧化反应, 氧还循环和肝脏解毒功能有关。CYP2E1 的作用底物包括小分子的疏水致癌化合物, 如苯、四氯化碳、氯乙烯、丙烯腈(acrylonitrile)和 N-二甲基亚硝胺(N-dimethylnitrosamine)(Gonzalez and Gelboin, 1994; Rannug *et al.*, 1995; Ingelman-Sundberg *et al.*, 1992)。Uematsu 等(1991)曾报道了外周血中淋巴细胞的二等位基因的 D1al 多态性(two allele D1al polymorphism)现象。日本人 C 等位基因频率是 26%, 有证据表明它与肺癌有关, 但研究的数量不多, 这种多态的表型目前仍不清楚(Uematsu *et al.*, 1991)。高加索人中该基因的频率是 11%, 也没有观察到它与肺癌发病的联系(Ingelman-Sundberg *et al.*, 1992; Persson *et al.*, 1993; Hirvonen *et al.*, 1993b; Kato *et al.*, 1992)。但是关于墨西哥裔美国人和非洲裔美国人的研究表明二者具有相关性(Wu *et al.*, 1998)。基因频率偏低及其与疾病的弱相关性, 说明已知 CYP2E1 多态型对大多数人类种群的致病风险是比较小的。

#### (4) 其他 CYP

CYP1B1 蛋白在人体肺脏中大量存在,据研究报道 CYP1B1 第 199 位 Ala 密码转变为 Ser 与肺癌的发病有关(Watanabe *et al.*, 1998)。CYP2C9 在肺组织以多态形式存在,并且可以激活 PAHs。Ile359 多态型可能与肺癌发病有一定联系( $p < 0.05$ )(Kadlubar *et al.*, 1998)。

#### 6.7.2.2 上呼吸道癌症

CYP2E1 多态性与鼻咽癌的发病有关,这种恶性肿瘤被认为是接触亚硝胺所致(Hildesheim *et al.*, 1995)。对一个由 364 中国人后裔组成的种群进行研究证明,鼻咽癌与 CYP2E1C2( $p < 0.05$ )等位基因有关(Hildesheim *et al.*, 1997)。另一项报道指出口腔癌患者中 CYP2E1C2 等位基因频率增高,当然这并不排除遗传-环境的相互作用,如嚼槟榔、吸烟、喝酒等(Hung *et al.*, 1997)。在高加索人中没有发现 CYP1A1MspI 或 CYP2E1Dral-C 多态性与上呼吸道癌症有关(Lucas *et al.*, 1996)。法国的一项研究表明吸烟量,CYP2D6 的强代谢表型与鼻咽癌的发病有关(Benhamou *et al.*, 1996)。也有报道认为欧洲人 CYP1A1ml/ml(MspI)、CYP1AL1 Val/Val、CYP2E1 C/C、CYP2B1 Cl/Cl 和 CYP2D6 强代谢基因型与上呼吸道癌没有关系(Mathias *et al.*, 1998)。

#### 6.7.2.3 肝癌

CYP2D6 强代谢表型基因型与肝癌的发病有关,尤其是在 N-乙酰基转移酶-2-基因型的共同作用下(Agundez *et al.*, 1996)。一项研究认为肝癌患者中 CYP2E1 C1/C1 的频率比吸烟者高。但另一项研究认为 CYP2E1 C1 的基因频率与肝癌无关(Lee *et al.*, 1997)。日本的一项研究认为 CYP2E1 C2 等位基因频率与胃癌发病无关(Kato *et al.*, 1992)。

### 6.7.3 抗癌药物的代谢

这里主要讨论哪些 CYP 参与抗癌药物的代谢,它们是增强还是减弱抗癌药的效果,代谢是否引起药物的相互作用,消化道的代谢是否会影响机体药物的吸收,药物代谢器官或组织的特异性,以及亚种群中,CYP 多态对药效的影响等。

了解哪些 CYP 参与某种抗癌药物的代谢是估计是否会发生药物相互作用的关键。环磷酰胺(cyclophosphamide)和异环磷酰胺(ifosfamide)等烷化抗癌药需要生物激活后才能转变为细胞毒剂。CYP2B6 和 3A4 最初被认为是参与环磷酰胺和异环磷酰胺生物活化的主要细胞色素蛋白(Chang *et al.*, 1993; Code *et al.*, 1997)。后来发现 CYP3A4 也参与异环磷酰胺的 N-去氯乙基化作用(N-dechloroethylation),这是一个治疗失活反应(Walker *et al.*, 1994)。然而 CYP2B6 和 3A4 对这些药物的亲和力相对较低,由此提出可能存在药物间相互作用。近来对环磷酰胺、异环磷酰胺以及重组人类 CYP 的研究发现 CYP1C19 对环磷酰胺的亲和力最强,其次是 CYP2C9。而 CYP2C18-Thr(385)和 CYP2C18-Met(385)的表型对环磷酰胺的催化活性相同,但对异环磷酰胺而言,CYP2C18-Thr(385)比 CYP2C18-Met(385)的催化活性高 6 倍。因此,基因型是 CYP2C18-Thr(385)

个体对异环磷酰胺的治疗反应更好。尽管还没有体内研究的资料,但已有的证据说明在考虑治疗范围较窄的抗癌药物的用药剂量时,应注意病人的 CYP 基因型。

一项利用原代培养人肝细胞的研究表明,与环磷酰胺和异环磷酰胺活化有关的 4-羟化反应是被 CYP2B, 2C 和 3A 诱导的,这表明了两种药物的细胞毒性是由几种 CYP 调节的。此外,两种药物很可能通过诱导 CYP 而影响自身的生物活化(Chang *et al.*, 1997)。如果环磷酰胺、异环磷酰胺等依赖 CYP 的抗肿瘤药物的生物激活能被局限于靶器官,它们的疗效是最为理想的。但是,肝脏的前期代谢使药物具有血、肾以及心血管毒性,因而削弱对乳腺癌的治疗效果(Chen *et al.*, 1996)。

抗癌药物表鬼臼脂素(epipodophyllotoxins)、表鬼臼毒(teniposide)和鬼臼乙叉甙(etoposide)的 O-去甲基作用(O-demethylation)主要由肝脏 CYP3A4 催化,但这并不是药物清除的主要步骤(Relling *et al.*, 1992),其产物是具有细胞毒性的儿茶酚类。由于 CYP3A4 能催化许多药物的代谢,它在激活鬼臼乙叉甙和表鬼臼毒时可引起药物间相互作用,这一点在喹啉的体外研究中得到了证实(Zhao *et al.*, 1998)。

抗乳腺癌药物-三苯氧胺(tamoxifen)是雌激素受体阻断剂,可以被肝微粒体催化(Crewe *et al.*, 1997)。主要代谢途径是 CYP3A 催化的 N-脱甲基化(Jacolot *et al.*, 1991),次要的代谢途径是 4'-和 4-羟化作用以及 N-氧化反应(Lim *et al.*, 1994)。反式-4-羟基三苯氧胺(Trans-4-hydroxytamoxifen)的作用比三苯氧胺强 100 倍,并能引起临床反应(Pathak *et al.*, 1995)。CYP2D6、2C9 和 3A4 参与三苯氧胺的 4-羟化作用(Crewe *et al.*, 1997),但后来的研究认为 CYP2D6 是肝脏 4-羟化反应的主要催化剂(Dehal and Kupfer, 1997),这再次说明了 CYP2D6 底物相互作用的可能性。由于 CYP2D6 具有多态性,所以三苯氧胺的疗效可能与病人 CYP2D6 基因型有关。

抗癌药红豆杉醇(taxol)也是一类 CYP 作用底物,可转化为无活性 6a-羟基红豆杉醇(6a-hydroxytaxol)和两种小分子代谢产物。其中一个反应是由 CYP3A4 催化的(Harris 等, 1994)。红豆杉醇代谢增强将减弱其药效,早期的研究认为 CYP3A(除 CYP3A4)催化 6a-羟基三苯氧胺的形成(Kumar *et al.*, 1994)。但后来的研究认为 CYP2 家族(很可能是 CYP2C8)催化这一反应(Cresteil *et al.*, 1994; Rahman *et al.*, 1994)。

一种特殊的机制阻断了 CYP 对视黄酸的催化作用,因此增强了抗前列腺癌药物 liarozole fumarate 的抗增殖和促分化作用。药物的代谢有多种效果。治疗前列腺癌的药物氟他米特(flutamide),主要被 CYP1A2 催化生成主要代谢产物 2-羟基氟他米特。氟他米特是雌激素受体拮抗剂,但是高浓度的 2-羟基氟他米特反而能激活受体,这可能导致了晚期前列腺癌患者对氟他米特的异常反应(Hasler *et al.*, 1999)。

#### 6.7.4 CYP 在肿瘤组织的表达以及癌症的化学敏感性

基于 CYP 在正常组织和肿瘤组织的不同表达,可以寻找一种非常有希望的抗癌疗法。癌组织内高水平的 CYP 可以提高依赖 CYP 的药物的选择性和敏感性。利用体外培养的 MCF-7 乳腺癌细胞对此进行的研究表明,转染 CYP2B1 可以极大地提高癌细胞对环磷酰胺和异环磷酰胺的敏感性(Chen *et al.*, 1996)。在小鼠的体内,转染 CYP2B1 的细胞对环磷酰胺极为敏感,但并不增加其对宿主的药物毒性。有一些研究报道了肿瘤组织

和周围组织 CYP 表达有显著差异。在试图改进胃癌的药物治疗时,对 CYP1A、2E1、3A4 等在正常组织和癌组织中的表达的差异进行研究具有重要的意义。Hasler 等(1999)报道在癌组织中, CYP1A 和 3A 的含量分别为 51% 和 28%,而在正常组织中,没有检测到 CYP1A 和 3A。对 CYP 在前列腺癌中的表达和细胞定位研究发现,肿瘤组织中 CYP1A、2C、3A 蛋白含量分别为 63%、25%、60%,而未恶性的前列腺上皮组织仅表现 CYP1A 和 2C 的免疫活性(Hasler *et al.*, 1999)。

对新近发现的 CYP1 家族成员 CYP1B1 的表达部位至今仍有争议。尽管已有报道证明了 CYP1B1mRNA 在正常乳腺组织的表达很活跃(Huang *et al.*, 1996),可是另一项研究认为 CYP1B1 蛋白仅在肿瘤组织中表达。食道癌组织中 CYP1A1 水平远高于正常食道组织(Nakajima *et al.*, 1994)。也有一些研究发现 CYP 在肿瘤组织的表达水平低于周围正常组织。原发性肝癌和肝转移癌的肿瘤周围组织 CYP17(芳化酶)含量增高。邻近病灶的组织 CYP17 活性最高,比肿瘤组织高 20 倍,其活性随距离的增大而降低。但乳腺癌的癌组织中 CYP17 水平显著高于非恶变组织,这可能是由于转录调控的改变所致。CYP 在肿瘤组织和正常组织的表达差异也可能不利于抗癌药的疗效。有人认为 CYP 介导的生物激活作用的减弱导致乳腺癌对多种药物不敏感(Peters and Roelofs, 1997)。

Rintala 等测量了 50 例肾切除的肾细胞癌患者病灶附近正常组织的 CYP1A1 水平(Rintala *et al.*, 1998),发现低分化和/或转移癌的 CYP1A1 水平显著高于高分化和/或原发癌,因此,肾癌的恶性度越高,正常组织中 CYP1A1 含量越高。直肠腺癌患者正常组织和肿瘤组织的 CYP1A1 表达没有差异。但在肿瘤组织内,CYP3A 水平降低了 50%。

### 6.7.5 基因治疗

向肿瘤组织导入活化抗癌化疗药物前体的酶可以增强药物的细胞毒性而不影响正常组织。但到目前为止,这方面的研究仅限于模型动物和人的体外培养细胞系。如 CYP2B1 肿瘤组织内的表达增加可以使其对烷化环磷酰胺的细胞毒性更为敏感。由于 NADPH-P450 还原酶在体内的广泛表达,并能催化 CYP 介导的药物代谢,因此,内源性或转染的这种酶的超量表达使大鼠神经胶质肉瘤细胞对药物的敏感性高于正常对照组(Chen *et al.*, 1997)。这种方法已应用于一种神经胶质瘤的模型动物(Manome *et al.*, 1996)。将 CYP2B1 导入乳腺癌 MCF-7 细胞系,可以增强环磷酰胺和异环磷酰胺的细胞毒性,但 CYP2B1 的抑制剂甲吡酮(metyrapone)可以阻断这种作用,并可影响到周围未经转染的细胞。对一种模型裸鼠的研究证实了这一结果(Chen *et al.*, 1996)。兔的 CYP4B1 可使惰性的 2-氨基蒽(2-aminoanthracene)和 4-蕃薯宁(4-ipomeanol)的药物前体转化成毒性很强的烷化代谢物。转染 CYP4B1 并能稳定表达 CYP4B1 蛋白的人类及啮齿类神经胶质瘤细胞对药物的敏感性增加了 6 倍(Rainov *et al.*, 1998)(有关内容详见第十二章)。

总之,肝脏疾病中 P450 表达的改变在很大程度上是由于各种 CYP 基因的调控紊乱所致,这需要了解各种蛋白的变化情况,才能评估肝脏硬化对某种药物或外源物质的代谢能力。药物代谢的改变同样为定量测定肝脏功能并估计慢性肝病(如 C 型肝炎)和原发性胆性肝硬化的发病阶段提供依据。炎症介质可以改变 CYP 表达对病毒性肝炎和其他

传染病的治疗具有越来越重要的意义。P450 与很多疾病的发生及病理学的研究只是最近才被重视，并成为发展非常迅速的一个领域。最后，能够确定影响各种肝脏 P450 表达的遗传因子，将为安全有效地药物治疗带来革命性的变化。

### 参 考 文 献

Abdel-Razzak Z, Loyer P, Fautrel A *et al.* 1993. Cytokines down-regulate expression of major cytochrome P450 enzymes in adult human hepatocytes in primary culture. *Mol. Pharmacol.*, 44: 707~715

Adedoyin A, Arns P A, Richards W O *et al.* 1998. Selective effect of liver disease on the activities of specific metabolizing enzymes: Investigation of cytochrome 2C19 and 2D6. *Clin. Pharm. Ther.*, 64: 8~17

Agundez JAG, Martinez C, Ladero J M *et al.* 1994. Debrisoquine oxidative genotype and susceptibility to lung cancer. *Clin. Pharm. Ther.*, 55: 10~14

Agundez JAG, Olivera M, Ladero J M *et al.* 1996. Increased risk for hepatocellular carcinoma in NAT2-slow acetylators and CYP2D6-rapid metabolizers. *Pharmacogenetics*, 6: 501~512

Amos C J, Caporaso N E, Western A. 1992. Host factors in lung cancer risk: A review of interdisciplinary studies. *Cancer Epidemiol. Prev.*, 1: 505~513

Azer S A, Murray M, Farrell G C *et al.* 1993. Selectivity and sensitivity of changes in serum bile acids during induction of cirrhosis in rats. *Hepatology*, 18: 1224~1231

Bartsch H, Castegnaro M, Camus A M *et al.* 1993. Analysis of DNA adducts in smokers' lung and urothelium by  $^{32}\text{P}$ -postlabelling; metabolic phenotype dependence and comparison with other exposure markers. In: Phillips, DH, Castegnaro M, Bartsch, H, (eds.), *Postlabelling Methods for Detection of DNA products*. IARC, Lyons, 331~340

Benhamou S, Bouchardy C, Paoletti C *et al.* 1996. Effects of CYP2D6 activity and tobacco on larynx cancer risk. *Cancer Epidemiol. Biom. Prev.*, 5: 683~686

Benitez J, Ladero J M, Jara C *et al.* 1991. Polymorphic oxidation of debrisoquine in lung cancer patients. *Eur. J. Cancer*, 27: 158~161

Bertilsson L, Lou Y Q, Du Y L *et al.* 1992. Pronounced differences between native Chinese and Swedish populations in the Polymorphic hydroxylations of debrisoquine and S-mephetoin. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 51: 388~397

Bouchardy C, Benhamou S, Dayer P. 1996. The effect of tobacco on lung cancer risk depends on CYP2D6 activity. *Cancer Res.*, 56: 251~253

Brodie M J, Boobis A R, Bulpitt C J *et al.* 1981. Influence of liver disease and environmental factors on hepatic monooxygenase activity *in vitro*. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 20: 39~46

Broly F, Gaedigk K A, Heim M *et al.* 1991. Debrisoquine/sparteine hydroxylation genotype and phenotype. Analysis of common mutations and alleles of CYP2D6 in a European population. *DNA Cell. Biol.*, 10: 545~558

Cantrill E, Murray M, Mehta I, Farrell G C. 1989. Down-regulation of the male-specific hepatic microsomal steroid 16 $\alpha$ -hydroxylase cytochrome P450 UT-A in rats with portal bypass: relevance to estradiol accumulation and impaired drug metabolism in hepatic cirrhosis. *J. Clin. Invest.*, 83: 1211~1216

Caporaso N E, Shields P G, Landi M T *et al.* 1992. The debrisoquine metabolic phenotype and DNA-based assays: implications of misclassification. *Env. Health Persp.*, 98: 101~105

Caporaso N E, Tucker M A, Hoover R E *et al.* 1990. Lung cancer and the debrisoquine metabolic phenotype. *J. Natl. Cancer Inst.*, 82: 1264~1271

Carelli M, Porras M, Rizzardini M *et al.* 1996. Modulation of constitutive and inducible hepatic cytochrome(s) P450 by interferon  $\beta$  in mice. *J. Hepatol.*, 24: 230~237

Carlson T J, Billings R E. 1996. Role of nitric oxide in the cytosine-mediated regulation of cytochrome P450. *Mol. Pharmacol.*, 49: 796~801

Chae Y H, Yun C H, Guengerich F P *et al.* 1993. Role of human hepatic and pulmonary cytochrome P450 enzymes in the metabolism of the environmental carcinogen 6-nitrochrysene. *Cancer Res.*, 53: 2028~2034

Chang TKH, Weber G F, Crespi C L *et al.* 1993. Differential activation of cyclophosphamide and ifosfamide by cytochrome P450 2B and 3A in human liver microsomes. *Cancer Res.*, 53: 5629~5637

Chang TKH, Yu L, Maurel P *et al.* 1997. Enhanced cyclophosphamide and ifosfamide activation in primary human hepatocyte cultures: Response to cytochrome P450 inducers and autoinduction by oxazaphosphorines. *Cancer Res.*, 57: 1946~1954

Chen J, Farrell G C. 1996. Bile acids produce a generalized reduction of the catalytic activity of cytochromes P450 and other hepatic microsomal enzymes *in vitro*: Relevance to drug metabolism-*etabolism* in experimental cholestasis. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 11: 870~877

Chen J, Murray M, Liddle C *et al.* 1995. Down-regulation of male-specific cytochrome P450s 2C11 and 3A2 in bile duct-ligated male rats: Importance to reduced hepatic content of cytochrome P450 in cholestasis. *Hepatology*, 22: 580~587

Chen J, Robertson G, Field J *et al.* 1998. Effects of bile duct ligation on hepatic expression of female-specific CYP2C12 in male and female rats. *Hepatology*

Chen J Q, Strom A, Gustafsson J A *et al.* 1995. Suppression of the constitutive expression of cytochrome P450 2C11 by cytokines and interferons in primary cultures of rat hepatocytes: Comparison with induction of acute phase genes and demonstration that CYP2C11 promoter sequences are involved in the suppressive response to interleukins 1 and 6. *Mol. Pharmacol.*, 47: 940~947

Chen L, Li L J, Waxman D J. 1997. Potentiation of cytochrome P450/cyclophosphamide-based cancer gene therapy by co-expression of the P450 reductase gene. *Cancer Res.*, 57: 4830~4837

Chen L, Waxman D J, Chen D S *et al.* 1996. Sensitization of human breast cancer cells to cyclophosphamide and ifosfamide by transfer of a liver cytochrome P450 gene. *Cancer Res.*, 56: 1331~1340

Cheung N W, Liddle C, Coverdale S *et al.* 1996. Growth hormone treatment increases cytochrome P450-mediated antipyrine clearance in man. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 81: 1999~2001

Code E L, Crespi C L, Penman B W *et al.* 1997. Human cytochrome P4502B6-individual hepatic expression, substrate specificity and role in procarcinogen activation. *Drug. Metab. Disp.*, 25: 985~993

Colli A, Buccino G, Coccio M *et al.* 1988. Disposition of a flow-limited drug (lidocaine) and a metabolic capacity-limited drug (theophylline) in liver cirrhosis. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 44: 642~649

Coutts R T, Urichuk L J. 1999. Polymorphic cytochromes P450 and drugs used in psychiatry. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 19(3): 325~353

Coverdale S, Byth K, Field J *et al.* 1995. Antipyrine clearance and response to interferon treatment in patients with chronic active hepatitis C. *Hepatology*, 22: 1065~1071

Craig P I, Mehta I, Murray M *et al.* 1990. Interferon down-regulates the male-specific cytochrome P450IIIA2 in rat liver. *Mol. Pharmacol.*, 38: 313~318

Craig P I, Tapner M, Farrell G C. 1993. Interferon suppressed erythromycin metabolism in rats and human subjects. *Hepatology*, 17: 230~235

Craig P I, Williams S J, Cantrill E *et al.* 1989. Rat but not human interferons suppress hepatic oxidative drug metabolism in rats. *Gastroenterology*, 97: 999~1004

Creteil T, Monsarrat B, Alvinerie P *et al.* 1994. Taxol metabolism by human liver microsomes: identification of cytochrome P450 isozymes involved in its biotransformation. *Cancer Res.*, 54: 386~394

Crewe H K, Ellis S W, Lennard M *et al.* 1997. Variable contribution of cytochromes P450 2D6, 2C9 and 3A4 to the 4-hydroxylation of tamoxifen by human liver microsomes. *Biochem. Pharmacol.*, 53: 171~178

Crofts F, Taioli E, Trachman J *et al.* 1994. Functional significance of different human CYP1A1 genotypes. *Carcinogenesis*, 15: 2961~2963

Dehal S S, Kupfer D. 1997. CYP2D6 catalyzes tamoxifen 4-hydroxylation in human liver. *Cancer Res.*, 57: 3402~3406

Desmond P V, Patwardhan P V, Johnson RF *et al.* 1980. Impaired elimination of caffeine in cirrhosis. *Dig. Dis. Sci.*, 5: 193~197.

Drakoulis N, Cascorbi I, Brockmoller J *et al.* 1994. Polymorphisms in the human CYP1A1 gene as a susceptibility factor for lung cancer. *Clin. Invest.*, 72: 240~248

Duche J C, Joanne C, Barre J *et al.* 1991. Lack of relationship between the polymorphism of debrisoquine oxidation and lung cancer. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 31: 533~536

Farrell G C. 1987. Drug metabolism in extrahepatic diseases. *Pharmacol. Ther.*, 35: 375~404

Farrell G C, Coverdale S A. 1998. Use of pharmacologic tests of liver functions in chronic viral hepatitis. *Viral Hep. Rev.*, 4: 47~73

Farrell G C, Koltai A. 1988. Hepatic testosterone metabolism in male rats with portal bypass. *Gastroenterology*, 95: 425~433

Farrell G C, Zaluzny L. 1984. Microsomal protein synthesis and induction of cytochrome P450 in cirrhotic rat liver. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, 62: 291~301

Farrell G C, Zaluzny L. 1985. Hepatic heme metabolism and cytochrome P450 in cirrhotic rat liver. *Gastroenterology*, 89: 172~179

Farrell G C, Cooksley WGE, Hart PH *et al.* 1978. Drug metabolism in liver disease. Identification of patients with impaired hepatic drug metabolism. *Gastroenterology*, 75: 580~588

Farrell G C, Cooksley WGE, Powell L W. 1979a. Drug metabolism in liver disease: Activity of hepatic drug metabolizing enzymes. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 26: 483~492

Farrell G C, Cooksley WGE, Powell L W. 1979b. Enhancement of hepatic drug metabolism by glutethimide in patients with liver disease. *Europ. J. Clin. Pharmacol.*, 16: 113~117

Farrell G C, Koltai A, Murray M. 1988. The source of raised serum estrogens in male rats with portal bypass. *J. Clin. Invest.*, 81: 221~228

Farrell G C, Koltai A, Zaluzny L *et al.* 1986. Effects of portal vein ligation on sex hormone metabolism in male rats: relationship to lowered hepatic cytochrome P450 levels. *Gastroenterology*, 90: 299~305

Fenyves D, Gariety L, Villeneuve J P. 1993. Clearance by the liver in cirrhosis I. Relationship between propranolol metabolism *in vitro* and its extraction by the perfused liver in the rat. *Hepatology*, 17: 301~306

Fatarone J R, Coverdale S A, Batey R G *et al.* 1991. Non-alcoholic steatohepatitis: Impaired antipyrine metabolism and hyper-triglyceridemia may be clues to its pathogenesis. *J. Gastroenterol. Hepatology*, 6: 585~590

Fishman J, Hellman L, Zumoff B *et al.* 1965. Effect of thyroid on hydroxylation of estrogen in man. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 25: 365~368

Flexner C. 1998. HIV-protease inhibitors. *N. Engl. J. Med.*, 338: 1281~1292

Fouts J R, Dixon R L, Shultice R W. 1961. The metabolism of drugs by regenerating liver. *Biochem. Pharmacol.*, 7: 265~270

Gariety L, Fenyves D, Kassissia I *et al.* 1993. Clearance by the liver in cirrhosis II. Characterization of propranolol uptake with the multiple-inductor dilution technique. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 8: 823~831

George J, Byth K, Farrell G C. 1996. Influence of clinicopathological variables on CYP protein expression in human liver. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 11: 33~39

George J, Murray M, Byth K *et al.* 1995a. Differential alterations of cytochrome P450 proteins in livers from patients with severe chronic liver disease. *Hepatology*, 21: 120~128

George J, Liddle C, Murray M *et al.* 1995b. Pre-translational regulation of cytochrome P450 genes is responsible for disease-specific changes of individual P450 enzymes among patients with cirrhosis. *Biochem. Pharmacol.*, 49: 873~881

Ghosh S S, Basu A, Ghosh R *et al.* 1995. Renal and hepatic CYP3A in spontaneously hypertensive rats. *Biochem. Pharmacol.*, 50: 49~54

Gonzalez F J, Gelboin H V. 1994. Role of human cytochrome P450 in the metabolic activation of chemical carcinogens and toxins. *Drug Metab. Rev.*, 26: 165~183

Guengerich F P. 1988a. Roles of cytochrome P450 enzymes in chemical carcinogenesis and cancer chemotherapy. *Cancer Res.*, 48: 2946~2954

Guengerich F P. 1991. Oxidation of toxic and carcinogenic chemicals by human cytochrome P450 enzymes. *Chem. Res. Toxicol.*, 4: 391~407

Guengerich F P, Turvy C G. 1991. Comparison of levels of several human microsomal cytochrome P450 enzymes and epoxide hydroxylase in normal and disease states using immunochemical analysis of surgical liver samples. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 256: 1189~1194

Guengerich F P, Gillam EMJ, Shimada T. 1996. New applications of bacterial systems to problems in toxicology. *Crit. Rev. Toxicol.*, 26: 551~583

Guengerich F P, Hosea N A, Johnson W W *et al.* 1998. Catalytic properties of cytochrome P450 3A enzymes. In: *Microsomes and Drug Oxidations*. Proceedings of the 12th International Symposium

Hamada G S, Sugimura H, Suzuki I *et al.* 1995. The heme-binding region of CYP1A1, rather than the Rsa polymorphism of CYP2E1, is associated with lung cancer in Rio de Janeiro. *Cancer Epid. Biom. Prev.*, 4: 63~67

Hammons G J, Guengerich F P, Peter W *et al.* 1985. Metabolic oxidation of carcinogenic arylamines by rat, dog and human hepatic microsomes and by purified flavin-containing and cytochrome P450 monooxygenases. *Cancer Res.*, 45: 3578~3585

Harris J W, Rahman A, Kim B R *et al.* 1994. Metabolism of taxol by human hepatic microsomes and liver slices: Participation of cytochrome P4503A4 and unknown P450 enzyme. *Cancer Res.*, 54: 4026~4035

Hashimoto H, Nakagawa T, YoKoi T *et al.* 1995a. Fetus-specific CYP3A7 and adult-specific CYP3A4 expressed in Chinese hamster CHL cells have similar capacity to activate carcinogenic mycotoxins. *Cancer Res.*, 55: 787~791

Hashimoto H, Yanagawa Y, Sawada M *et al.* 1995b. Simultaneous expression of human CYP3A7 and N-acetyltransferase in Chinese hamster CHL cells results in high cytotoxicity for carcinogenic heterocyclic amines. *Arch. Biochem. Biophys.*, 320: 323~329

Hasler J A, Estabrook R and Murray M *et al.* 1999. Human cytochrome P450. *Molecular Aspects of Medicine*, 20: 55~84

Hayashi S, Watanabe J, Kawajiri K. 1992. High susceptibility to lung cancer analysed in terms of combined genotypes of P4501A1 and Mu-class glutathione S-transferase genes. *Jpn. J. Cancer Res.*, 83: 866~870

Hayes C L, Spink D C, Spink B *et al.* 1996. 17 $\beta$ -estradiol hydroxylation catalyzed by human cytochrome P4501B1. *PNAS*, 93: 9776~9781

Hickey P L, Angus P W, McLean A J *et al.* 1995. Oxygen supplementation restores theophylline clearance to normal in cirrhotic rats. *Gastroenterology*, 101: 1504~1509

Hickey P L, McLean A J, Angus P W *et al.* 1996. Increased sensitivity of propanolol clearance to reduced oxygen delivery in the isolated perfused cirrhotic rat liver. *Gastroenterology*, 111: 1039~1048

Hildesheim A, Anderson L M, Chen C J *et al.* 1997. CYP2E1 genetic polymorphisms and risk of nasopharyngeal carcinoma in Taiwan. *J. Natl. Cancer Inst.*, 89: 1207~1212

Hildesheim A, Chen C J, Caporaso N E *et al.* 1995. Cytochrome P4502E1 genetic polymorphisms and risk of nasopharyngeal carcinoma: results from a case-control study conducted in Taiwan. *Cancer Epid. Biom. Prev.*, 4: 607~610

Hirvonen A, Husgafvel-Pursiainen K, Anttila S *et al.* 1993a. PCR-based CYP2D6 genotyping for Finnish lung cancer patients. *Pharmacogenetics*, 3: 19~27

Hirvonen A, Husgafvel-Pursiainen K, Anttila S *et al.* 1993b. The human CYP2E1 gene and lung cancer: D<sub>1</sub>ral and RsaI restriction fragment length polymorphisms in a Finnish study population. *Carcinogenesis*, 14: 85~88

Hirvonen A, Husgafvel-Pursiainen K, Karjalainen A, Anttila S *et al.* 1992. Point-mutational Mspl and Ile-Val polymorphisms closely linked in the CYP1A1 gene: lack of association with susceptibility to lung cancer in a Finnish study population. *Cancer Epid. Biom. Prev.*, 1: 485~489

Ho K, Weissberger A J. 1990. Secretory patterns of growth hormone according to sex and age. *Horm. Res.*, 33: 7~11

Hoyumpa A, Schenker S. 1991. Is glucuronidation truly preserved in patients with chronic liver disease? *Hepatology*, 13: 786~795

Hu Y, Ingelman-Sundberg M, Lindros K O. 1995. Induction mechanism of cytochrome P450 2E1 in liver interplay between ethanol treatment and starvation. *Biochem. Pharmacol.*, 50: 155~161

Huang Z Q, Guengerich F P, Kaminsky L S. 1998. 16 $\alpha$ -hydroxylation of estrone by human cytochrome P4503A4/5. *Carcinogenesis*, 19: 867~872

Huet P M, Villeneuve J P. 1983. Determinants of drug disposition in patients with cirrhosis. *Hepatology*, 3: 913~918

Hung H C, Chuang J, Chien Y C et al. 1997. Genetic polymorphisms of CYP2E1, GSTM1 and GSTT1; Environmental factors and risk of oral cancer. *Cancer Epid. Biom. Prev.*, 6: 901~905

Ingelman-Sundberg M, Johansson I, Persson I et al. 1992. Genetic polymorphism of cytochrome P450: interethnic differences and relationship to incidence of lung cancer. *Pharmacogenetics*, 2: 264~271

Iqbal S, Vickers C, Elias E. 1990. Drug metabolism in end-stage liver disease. *In vitro* activation of some phase I and Phase II enzymes. *J. Hepatology*, 11: 37~42

Israel B C, Blouin R A, McIntyre W et al. 1993. Effects of interferon a monotherapy on hepatic drug metabolism in cancer patients. *Br. J. Clin. Pharmacology*, 36: 229~235

Jacquot F, Simon I, Dreano Y, Beaune P et al. 1991. Identification of the cytochrome P450 IIIA family as the enzymes involved in the N-demethylation of tamoxifen in human liver microsomes. *Biochem. Pharmacol.*, 41: 1911~1919

Jiang X M, Cantrill E, Farrell G C et al. 1994. Pre-translational downregulation of male specific hepatic P450s after portal bypass. *Biochem. Pharmacol.*, 48: 701~708

Joeres R, Klinker H, Heusler H et al. 1988. Influence of smoking on caffeine elimination in healthy volunteers and in patients with alcoholic liver cirrhosis. *Hepatology*, 8: 575~579

Kadlubar F F. 1998. Unpublished: symposium on Clinical Implications of the Molecular Epidemiology of Lung Cancer. Oslo 11: August

Kato S, Shields P G, Caporaso N E et al. 1992. Cytochrome P4502E1 genetic polymorphisms. Racial variation and lung cancer risk. *Cancer Res.*, 52: 6712~6715

Kawajiri K, Fujii-Kuriyama Y. 1991. P450 and human cancer. *Japanese J. Cancer Res. (Amsterdam)*, 82: 1325~1335

Kaeajiri K, Eguchi H, Nakachi K et al. 1996. Association of CYP1A1 germ line polymorphisms with mutations of the p53 gene in lung cancer. *Cancer Res.*, 56: 72~76

Kaeajiri K, Nakachi K, Imai K et al. 1993. The CYP1A1 gene and cancer susceptibility. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 14: 77~87

Kawajiri K, Nakachi K, Imai K et al. 1990. Identification of genetically high risk individuals to lung cancer by DNA polymorphisms of the cytochrome P4501A1 gene. *FEBS, Lett.*, 263: 131~133

Kellerman G, Shaw C R, Luyten-Kellerman M. 1973. Arylhydrocarbon hydroxylase and bronchogenic carcinoma. *New Eng. J. Med.*, 289: 934~937

Kihara M, Noda K, Kihara M. 1995. Distribution of GSTM1 null genotype in relation to gender age and smoking status in Japanese lung cancer patients. *Pharmacogenetics*, 5: 874~879

Kleinblossem C H, Harten J, van JPH et al. 1986. Nifedipine: kinetics and hemodynamic effects in patients with liver cirrhosis after intravenous and oral administration. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 40: 21~28

Kouri R E, Billups L H, Rude T H et al. 1980. Correlation of inducibility of AHH with susceptibility to 3-methylcholanthrene-induced lung cancers. *Cancer. Lett.*, 9: 77~284

Kouri R E, McKinney C E, Levine A S et al. 1982. Positive correlation between high AHH activity and primary lung cancer analyzed in cryopreserved lymphocytes. *Cancer Res.*, 42: 5030~5039

Kumar G N, Walle U K, Walle T. 1994. Cytochrome P450 3A-mediated human liver microsomal taxol 16 $\alpha$ -hydroxylation. *J. Pharmacol. Exp. Therapeut.*, 268: 1160~1165

Landi M T, Bertazzi P A, Shields P G et al. 1994. Association between CYP1A1 genotype, mRNA expression and enzymatic activity humans. *Pharmacogenetics*, 4: 242~246

Langouet S, Coles B, Morel F, Becquemont L et al. 1995. Inhibition of CYP1A2 and CYP3A4 by oltipraz results in reduction of aflatoxin B metabolism in human hepatocytes in primary culture. *Cancer Res.*, 55: 5574~5579

Leclercq I, Horsmans Y, Desager JP et al. 1996. Influence of diet on liver volume and cytochrome P450 (CYP) activities in human non-alcoholic fatty liver. *Hepatology*, 24: 311 (Abstract)

Lee HS, Yoon J H, Kamimura S *et al.* 1997. Lack of association of cytochrome P450 2E1 genetic polymorphisms with the risk of human hepatocellular carcinoma. *Int J. Cancer*, 71: 737~740

Levitsky L L, Scholler D A, Lambert G H *et al.* 1989. Effect of growth hormone therapy in growth hormone deficient children on P450 demethylation of caffeine. *Dev. Pharmacol. Ther.*, 12: 90~95

Liddle C, Goodwin B J, George J *et al.* 1998. Separate and interactive regulation of cytochrome P450 3A4 by triiodothyronine dexamethasone and growth hormone in cultured hepatocytes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 83: 2411~2416

Liddle C, Hollands M, Little J M *et al.* 1992. The effects of partial hepatectomy on serum sex steroids in humans. *Hepatology*, 15: 623~628

Liddle C, Murray M, Farrell G C. 1989. Effect of liver regeneration on hepatic cytochrome P450 isozymes and serum sex steroids in the male rat. *Gastroenterology*, 96: 864~872

Lieber C S. 1997. Cytochrome P4502E1: its physiological and pathological role. *Physiol. Rev.*, 77: 517~544

Liehr J G, Roy D, Ari-Ulubelen A *et al.* 1990. Effect of chromic estrogen treatment of Syrian hamsters on microsomal enzymes mediating formation of catechols-trogens and their redox cycling: Implications for carcinogenesis. *J. Steroid Biochem.*, 35: 555~560

Lim C K, Yuan Z X, Lamb J H *et al.* 1994. A comparative study of tamoxifen metabolism in female rat, mouse and human liver microsomes. *Carcinogenesis*, 15: 589~593

Lown K, Kolars J, Turgeon K *et al.* 1992. The erythromycin breath test selectively measures P450 III A in patients with severe liver disease. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 51: 229~238

Lucas D, Menez C, Floch F *et al.* 1996. Cytochrome P4502E1 and P4501A1 genotypes and susceptibility to cirrhosis or upper aero-digestive tract cancer in alcoholic Caucasians. *Alcoholism Clin. Exp. Res.*, 20: 1033~1037

Manome Y, We P Y, Chen L *et al.* 1996. Gene therapy for malignant gliomas using replication incompetent retroviral and adenoviral vectors encoding the cytochrome P450 2B1 gene together with cyclophosphamide. *Gene Therapy*, 3: 513~520

Matthias C, Bockmuhl U, Jahnke V *et al.* 1998. Polymorphism in cytochrome and glutathione S-transferase GSTM1, GSTM3, GSTT1 and susceptibility to tobacco-related cancers-studies in upper aerodigestive tract cancers. *Pharmacogenetics*, 8: 91~100

Meyer-Wyss B, Renner E, Luo H *et al.* 1993. Assessment of lidocaine metabolite formation in comparison with other quantitative liver function tests. *J. Hepatol.*, 19: 133~139

Miguet J P, Vuitton D, Thebault-Lucas A *et al.* 1980. Spironolactone and enzyme induction in patients with cirrhosis. *Gastroenterology*, 78: 996~1000

Morgan D J, McLean A J. 1995. Clinical pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations in patients with liver disease. *Clin. Pharmacokinet.*, 29: 287~391

Morgan E T. 1989. Suppression of constitutive cytochrome P450 gene expression in livers of rats undergoing an acute phase response to endotoxin. *Mol. Pharmacol.*, 36: 699~707

Morgan E T. 1993. Down-regulation of multiple cytochrome P450 gene-products by inflammatory mediators in vivo. *Biochem. Pharmacol.*, 45: 415~419

Muntane J, Longo V, Mitjavila M T *et al.* 1995. Effect of carrageenan-induced granuloma on hepatic cytochrome P450 isozymes in rats. *Inflammation*, 19: 143~156

Muntane-Relat J, Ourlin J C, Domergue J *et al.* 1995. Differential effects of cytokines on the inducible expression of CYP1A1, CYP1A2 and CYP3A4 in human hepatocytes in primary culture. *Hepatology*, 22: 1143~1153

Murray M, Farrell G C. 1984. Different effects of carbon tetrachloride toxicity and cirrhosis on substrate binding to rat hepatic microsomal cytochrome P450. *Biochem. Pharmacol.*, 33: 687~689

Murray M, Zaluzny L, Farrell G C. 1986a. Drug metabolism in cirrhosis: selective changes in cytochrome P450 isozymes in the choline-deficient rat model. *Biochem. Pharmacol.*, 35: 1817~1824

Murray M, Zaluzny L, Dannan G A *et al.* 1987a. Altered regulation of cytochrome P450 enzymes in cholinedeficient cirrhotic male rat liver. Impaired regulation and activity of the male-specific cytochrome P450 UTA in hepatic cirrhosis.

Mol. Pharmacol., 31: 117~121

Murray M, Zaluzny L, Farrell G C. 1987b. Impaired androgen 16 $\alpha$ -hydroxylation in hepatic microsomes from carbon tetrachloride-cirrhotic male rats. Gastroenterology, 93: 141~147

Murray M, Cantrill E, Mehta I et al. 1992. Impaired expression of microsomal cytochrome P450 2C11 in choline-deficient rat liver during the development of cirrhosis. J. Pharmacol. Exp. Ther., 261: 373~380

Nadin L, Butler A M, Farrell G C et al. 1995. Pre-translational down-regulation of cytochrome P450 2C11 and 3A2 in male rat liver by tumor necrosis factor- $\alpha$ . Gastroenterology, 109: 198~205

Nakachi K, Imai K, Hayashi S et al. 1993. Polymorphisms of the CYP1A1 and GST genes associated with susceptibility to lung cancer in relation to cigarette dose in a Japanese population. Cancer Res., 53: 2994~2999

Nakajima M, Yokoi T, Mizutani M et al. 1994. Phenotyping of CYP1A2 in Japanese population by analysis of caffeine urinary metabolites: absence of mutation prescribing the phenotype in the CYP1A2 gene. Cancer Epidemiol. Biomarkers. Prev., 4: 413~421

Nanji A A, Zakim D. 1996. Alcoholic liver disease. In: Zakim D, Boyer TD, (eds.). Hepatology: A Textbook of liver Disease. 3rd ed. W. B. Saunders, Philadelphia, 891~961

Nedelcheva V, Gut I. 1994. P450 in the rat and man: Methods of investigation, substrate specificity and relevance to cancer. Xenobiotica, 24: 1151~1175

Nelson E. 1964. Rate of metabolism of tolbutamide in test subjects with liver disease or with impaired renal function. Am. J. Med. Sci., 248: 657~659

Okuno H, Takasu M, Kano H et al. 1993. Depression of drug-metabolizing activity in the human liver by interferon- $\beta$ . Hepatology, 17: 65~69

Osborne M P, Bradlow H L, Wong GYC et al. 1993. Up-regulation of estradiol C16 alpha-hydroxylation in human breast tissue: a potential biomarker of breast cancer risk. J. Natl. Cancer. Inst., 85: 1917~1920

Pampori N A, Shapiro B H. 1996. Feminization of hepatic cytochrome P450s by nominal levels of growth hormone in the feminine plasma profile. Mol. Pharmacol., 50: 1148~1156

Pastorelli R, Guanci M, Cerri A et al. 1998. Impact of inherited polymorphisms in glutathione S-transferase M1, microsomal epoxide hydrolase, cytochrome P450 enzymes on DNA, blood protein adducts of benzo(a)pyrene-dioleopoxide. Cancer Epid. Biom. Prev., 7: 703~709

Pathak D N, Pongracz K, Bodell W J. 1995. Microsomal and peroxidase activation of 4-hydroxy-tamoxifen to form DNA adducts: comparison with DNA adducts formed in Sprague-Dawley rats treated with tamoxifen. Carcinogenesis, 16: 11~15

Persson I, Johansson I, Bergling H et al. 1993. Genetic polymorphism of cytochrome P4502e1 in a Swedish population: relationship to incidence of lung cancer. FEBS Lett., 319: 207~211

Persson I, Johansson I, Ingelman-Sundberg M. 1997. *In vitro* kinetics of two human CYP1A1 variant enzymes suggested to be associated with interindividual differences in cancer susceptibility. Biochem. Biophys. Res. Commun., 231: 227~230

Peters WHM, Roelofs HMJ. 1997. A mutation in exon 7 of the human cytochrome P4501A1 gene as marker for sensitivity to anti-cancer drugs. Brit. J. Cancer, 75: 1397~1399

Petersen D D, McKinney C E, Ikeya K et al. 1991. Human CYP1A1 Gene: Co-segregation of the enzyme inducibility phenotype and an RELP. Am. J. Hum. Genet., 48: 720~725

Petruzelli S, Camus A M, Carrozza L et al. 1988. Long-lasting effects of tobacco smoking on pulmonary drug and metabolizing enzymes: a case-control study on lung cancer patients. Cancer Res., 48: 4695~4700

Quan T, Reiners J J, Bell AO et al. 1994. Cytotoxicity and genotoxicity of (+)-benzo[a]pyrene-trans-7,8-dihydrodiol in CYP1A1-expressing human fibroblasts quantitatively correlate with CYP1A1 expression level. Carcinogenesis, 15: 1827~1832

Rahman A, Korzekwa K R, Grogan J et al. 1994. Selective biotransformation of taxol to 6 $\alpha$ -hydroxytaxol by human cytochrome P450 2C8. Cancer Res., 54: 5543~5546

Rainov N G, Dobberstein K U, Sena-Esteves M *et al.* 1998. New prodrug activation gene therapy for cancer using cytochrome P450 4B1 and 2-aminoanthracene/4-ipomeanol. *Human Gene Therapy*, 9: 1261~1273

Rannug A, Alexandrie A K, Persson I *et al.* 1995. Genetic polymorphism of cytochrome P4501A1, 2D6 and 2E1: Regulation and toxicological significance. *J. Occup. Env. Med.*, 37: 25~36

Raza H, King R S, Squires R B, Guengerich F P *et al.* 1996. Metabolism of 2-amino-ax-carboline-A foodheterocyclic mutagen and carcinogen by human and rodent liver microsomes and by human cytochrome P4501A2. *Drug Metab. Disp.*, 24: 395~400

Relling M V, Evans R, Dass C *et al.* 1992. Human cytochrome P450 metabolism of teniposide and etoposide. *J. Pharmacol. Exp. Therapeut.*, 261: 491~496

Rintala S, Tammela T L, Tuimala R. 1998. CYP1A1 activity in renal cell carcinoma and in adjacent normal renal tissue. *Urol. Res.*, 26(2): 117~121.

Robertson G R, Farrell G C, Liddle C. 1998. Sexually dimorphic expression of rat CYP3a9 and CYP3A18 genes is regulated by growth hormone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 242: 57~60

Ronis M J, Lumpkin C K, Thomas P E *et al.* 1992. The microsomal monooxygenase system of regenerating liver. An examination of the role estradiol in the demasculinization of drug metabolism produced by partial hepatectomy. *Biochem. Pharmacol.*, 43: 567~573

Ruder H, Corval P, Mahoudeah J A *et al.* 1971. Effects of induced hyperthyroidism on steroid metabolism in man. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 33: 382~387

Sabbagh N, Marez D, Queyrel V *et al.* 1998. Genetic analysis of the cytochrome P450 cyp2D6 polymorphism in patients with systemic lupus erythematosus. *Pharmacogenet.*, 8: 191~194

Sesardic D, Boobis A R, Edwards R J *et al.* 1988. A form of cytochrome P450 in man, orthologous to from d in the rat, catalyses the O-de-ethylation of phenacetin and is inducible by cigarette smoking. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 26: 363~372

Sharer J E, Wrighton S A. 1996. Identification of the human hepatic cytochromes P450 involved in the *in vitro* oxidation of antipyrine. *Drug Metab. Disp.*, 24(4): 487~494

Shaw G L, Falk R T, Deslauriers J *et al.* 1995. Debrisoquine metabolism and lung cancer. *Cancer Epidemiol. Biom. Prev.*, 4: 41~48

Shedlofsky S I, Israel B C, McClain C J *et al.* 1994. Endotoxin administration to humans inhibits hepatic cytochrome P450-mediated drug metabolism. *J. Clin. Invest.*, 94: 2209~2214

Shedlofsky S I, Swim A T, Robinson JM *et al.* 1987. Interleukin-1 (IL-1) depresses cytochrome P450 levels and activities in mice. *Life Sci.*, 40: 2331~2336

Shenfield G M. 1981. Influence of thyroid dysfunction on drug pharmacokinetics. *Clin. Pharmacokinet.*, 6: 275~297

Shields P G, Caporaso N E, Falk R T *et al.* 1993b. Lung cancer, race and a CYP1A1 genetic polymorphism. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2: 248~245

Shimada T, Okuda Y. 1988. Metabolic activation of environmental carcinogens and mutagens by human liver microsomes. *Biochem. Pharmacol.*, 37: 459~465

Shimada T, Iwasaki M, Martin M V *et al.* 1989a. Human liver microsomal cytochrome P450 enzymes involved in the bioactivation of procarcinogens detected by umu gene response in *Salmonella typhimurium* TA, 1535/pSK1002. *Cancer Res.*, 49: 3218~3228

Shimada T, Martin M V, Pruess-Schwartz D *et al.* 1989b. Roles of individual human cytochrome P450 enzymes in the bioactivation of benzo(a)pyrene, 7,8-dihydroxy-7,8-dihydrobenzo(a)pyrene, and other dihydrodiol derivatives of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Cancer Res.*, 49: 6304~6312

Shimada T, Yun C H, Yamazaki H *et al.* 1992. Characterization of human lung microsomal cytochrome P450 1A1 and its role in the oxidation of chemical carcinogens. *Mol. Pharmacology*, 41: 856~864

Shimada T, Gillam EMJ, Sandhu P *et al.* 1994a. Activation of procarcinogens by human cytochrome P450 enzymes expressed in *Escherichia coli*. Simplified bacterial systems for genotoxicity assays. *Carcinogenesis*, 15: 2523~2529

Shimada T, Hayes C L, Yamazaki H *et al.* 1996. Activation of chemically diverse procarcinogens by human cytochrome P450 1B1. *Cancer Res.*, 56: 2979~2984

Shou M G, Krausz K W, Gonzalez F J *et al.* 1996a. Metabolic activation of the potent carcinogen dibenzo [a,1]pyrene by human recombinant cytochrome P450, lung and liver microsomes. *Carcinogenesis*, 17: 2429~2433

Shou M G, Krausz K W, Gonzalez F J *et al.* 1996b. Metabolic activation of the potent carcinogen dibenzo [a,h]anthracene by cDNA-expressed human cytochrome P450. *Biochem. Biophys.*, 328: 201~207

Sotaniemi E A, Rautio A, Backstrom M *et al.* 1995. CYP3A4 and CYP2A6 activities marked by the metabolism of lignocaine and coumarin in patients with liver and kidney diseases and epileptic patients. *Br. J. Clin. Pharmac.*, 39: 71~76

Starets M E, Murphy S E, Patten C J *et al.* 1997. Comparative metabolism of the tobacco-related carcinogens benzo[a]pyrene, 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone, 4-(methylnitrosamino)-3-pyridyl)-1-butanone and N-nitrosonornicotine in human hepatic microsomes. *Drug Metab. Disp.*, 25: 154~162

Stucker I, Cosme J, Laurent P H *et al.* 1995. CYP2D6 genotype in lung cancer risk according to histologic type and tobacco exposure. *Carcinogenesis*, 16: 2759~2764

Sugimura H, Suzuki I, Hamada G S *et al.* 1994. Cytochrome P4501A1 genotype in lung cancer patients and controls in Rio de Janeiro, Brazil. *Cancer Epidemiol. Biom. Prev.*, 3: 145~148

Sugimura H, Wakai K, Genka K *et al.* 1998. Association of lle462Val(Exon 7) polymorphism of cytochrome P4501A1 with lung cancer in the Asian population: Further evidence from a case-control study in Okinawa. *Cancer Epid. Biom. Prev.*, 7: 413~417

Tapner M, Liddle C, Goodwin B *et al.* 1996. Interferon gamma down-regulates cytochrome P450 3A genes in primary cultures of well-differentiated rat hepatocytes. *Hepatology*, 24: 367~373

Tassaneeyakul W, Birkett D J, McManus M E *et al.* 1994. Caffeine metabolism by human cytochromes P450: contributions of 1A2, 2E1 and 3A isoforms. *Biochem. Pharmacol.*, 47: 1767~1776

Tefre T, Ryberg D, Haugen A, Nebert D W *et al.* 1991. Human CYP1A1 gene: lack of association between the MSP1 restriction fragment length polymorphisms and incidence of lung cancer in a Norwegian population. *Pharmacogenetics*, 1: 20~25

Tinel M, Robin M A, Doostzadeh J *et al.* 1995. The interleukin-2 receptor down-regulates the expression of cytochrome P450 in cultured rat hepatocytes. *Gastroenterology*, 109: 1589~1599

Tyndale R F, Aoyama T, Broly F *et al.* 1991. Identification of a new variant CYP2D6 allele lacking the codon encoding Lys-281: possible association with the poor metabolism phenotype. *Pharmacogenetics*, 1: 26~32

Uematsu F, Kikuchi H, Motomiya M *et al.* 1991. Association between RFLP of the human cytochrome P4502E1 gene and susceptibility to lung cancer. *Jpn. J. Cancer Res.*, 82: 254~256

Ueng Y F, Kuwabara T, Chun Y J *et al.* 1997. Cooperativity in oxidation catalyzed by cytochrome P450 3A4. *Biochemistry*, 36: 370~381

Walker D, Flinois J P, Monkman S C *et al.* 1994. Identification of the major human hepatic cytochrome P450 involved in activation and N-dechloroethylation of ifosfamide. *Biochem. Pharmacol.*, 47: 1157~1163

Watanabe J. 1998. Symposium on clinical implications of the molecular epidemiology of lung cancer. Oslo, 12, August

Waxman D J, Ram P A, Notani G *et al.* 1990. Pituitary regulation of the male-specific steroid 6 $\beta$ -hydroxylase P450 2a (gene product IIIA2) in adult rat liver. *Mol. Endocrinol.*, 4: 447~454

Waxman D J, Ram P A, Pompori N A, Shapiro B H. 1995. Growth hormone regulation of male specific rat liver P450 2A2 and 3A2: induction by intermittent growth hormone pulses in male but not female rats rendered growth hormone deficient by neonatal monosodium glutamate. *Mol. Pharmacol.*, 48: 790~797.

Weltman M D, Farrell G C, Hall P *et al.* 1998. Hepatic cytochrome P4502E1 is increased in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*, 27: 128~133

Williams S J, Farrell G C. 1986. Inhibition of antipyrine metabolism by interferon. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 22: 610~612

Williams S J, Farrell G C. 1989. Serial antipyrine clearance studies detect altered hepatic metabolic function during spontaneous and interferon-induced changes in chronic hepatic B disease activity. *Hepatology*, 10: 192~197

Wright K, Morgan E T. 1991. Regulation of cytochrome P450IIC12 expression by interleukin-1a, interleukin-6 and dexamethasone. *Mol. Pharmacol.*, 39: 468~474

Wu XF, Amos C I, Kemp B L *et al.* 1998. Cytochrome P450 2E1 D1al polymorphisms in lung cancer in minority populations. *Cancer Epid. Biom. Prev.*, 7:13~18

Xu X, Kelsey K T, Wiencke J K *et al.* 1996. Cytochrome P450 CYP1A1 msp1 polymorphism and lung cancer susceptibility. *Cancer Epid. Biom. Prev.*, 5: 687~692

Yager J D, Liehr J G. 1996. Molecular mechanisms of estrogen carcinogenesis. *Annual Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 36: 203~232

Yamagi T, Motohashi K, Murakawa S *et al.* 1969. Urinary excretion of 6 $\beta$ -hydroxyxortisol in states of altered thyroid function. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 29: 801~806

Yamazaki H, Mirmura M, Oda Y *et al.* 1994. Activation of trans-1,2-dihydro-1,2-dihydroxy-6-aminochrysene to genotoxic metabolites by rat and human cytochrome P450. *Carcinogenesis*, 15: 465~470

Zaphiropoulos P G, Mode A, Norstedt G *et al.* 1989. Regulation of sexual differentiation in drug and steroid metabolism. *Trends in Pharmacol. Sci.*, 10: 149~153

Zhang Z Y, Fasco M J, Huang L L *et al.* 1996. Characterization of purified human recombinant cytochrome P4501A1-Ile462 and Val462: Assessment of a role for the rare allele in carcinogenesis. *Cancer Res.*, 56: 3926~3933

Zhang Z Y, Kaminsky L S. 1995. Characterization of human cytochrome P450 involved in theophylline 8-hydroxylation. *Biochem. Pharmacol.*, 50: 205~211

Zhao X J, Kawashiro T, Ishizaki T. 1998. Mutual inhibition between quinine and etoposide by human liver microsomes Evidence for cytochrome P4503A4 involvement in their major metabolic pathways. *Drug Metab. Disp.*, 26: 188~191

## 第七章 植物细胞色素 P450 及其功能

P450 在植物界中广泛分布, 主要定位于内质网膜, 也有一些发现位于高尔基体膜上, 定位于线粒体和质膜上的也有报道(赵剑 *et al.*, 1999)。植物 P450 酶系与动物微粒体 P450 具有许多相似之处, 其基本的活性单元包括 P450 本身以及 NADPH 细胞色素 P450 还原酶(Durst *et al.*, 1992)。

植物 P450 在植物体担当着重要的功能, 可以催化许多次级代谢反应, 已知的催化反应已超过 50 种, 反应底物包括脂类、苯丙烷类、黄酮类、萜类、生物碱、生氰糖苷等内源性化合物以及包括农药、除草剂等在内的外源物质。涉及的反应机制有羟基化、环氧化、杂原子脱烷基、双键氧化、杂原子氧化等(Bolwell *et al.*, 1994)(表 7.1)。由于植物组织中存在许多干扰 P450 研究的因素, 如叶绿体(chlorophyll)和其他血红素蛋白光吸收的干扰, 不同型 P450 的相对含量少, P450 的纯化十分困难, 阻碍了分离和重组这些膜结合酶系工作的开展。至今植物 P450 反应大多是根据光可逆转 CO 抑制以及诱导剂与抑制剂辅助来鉴定(Bolwell *et al.*, 1994), 只有少数植物 P450 的活性在分子水平上得到了明确(Schuler, 1996a)。

表 7.1 植物 P450 对内源物质的代谢反应(Bolwell *et al.*, 1994)

	羟化酶	环氧化酶	合酶	脱甲基酶	氧化酶
1. 脂类	葵酸羟化酶	月桂酸类似物			
	月桂酸羟化酶	18-羟基亚油酸			
	肉豆蔻酸羟化酶	亚油酸氢过氧化物			
	油酸羟化酶				
	亚油酸羟化酶				
2. 苯丙烷和黄酮类	肉桂酸-4-羟化酶		黄酮合酶 II		
	阿魏酸-5-羟化酶		异黄酮合酶		
	p-莽草酸-3'-羟化酶		马米生合酶		
	类黄酮-3'-羟化酶		补骨脂素合酶		
	类黄酮-3',5'-羟化酶		补骨脂素 5-加单氧酶		
	异黄酮-2'-羟化酶				
	异黄酮-3'-羟化酶				
	异类黄酮-6a-羟化酶				
3. 萜类 单萜	香叶醇/橙花醇 10-羟化酶	橙花醇 2,3/6,7-环氧化酶			
	柠檬烯 3,6 或 7-羟化酶				
	枞酸二烯羟化酶				

续表

	羟化酶	环氧化酶	合酶	脱甲基酶	氧化酶
3. 蒽类	蒎烯羟化酶				
单萜	樟脑 6-羟化酶 冬青油烯羟化酶 萜品醇羟化酶				
倍半萜	甘薯黑孢霉酮(ipomeamarone) 羟化酶				
双萜	脱落酸 6-羟化酶				贝壳杉烯氧化酶
三萜	毛地黄昔 12-羟化酶  甘草亭酸 24-羟化酶			obtusifoliol 14a-脱甲 基酶	
4. 生物碱	前鸦片碱(protopine) 6-羟化 酶  二氢血根碱 10-羟化酶 dihydrochelirubine 12-羟化酶 dianthramide 4-羟化酶		小檗宁  salutaridine cheilanthifoline stylopene 前鸦片碱	烟碱	
5. 生氰糖苷	酪氨酸 N-羟化酶 对-羟基苯基乙腈羟化酶 L-缬氨酸 N-羟化酶 2-甲基丙醇肟羟化酶				

鉴定 P450 基因以及测定它们的生物化学功能是现在植物 P450 研究的核心。从分子水平上鉴定 P450 有两个基本途径,一是通过 P450 蛋白纯化,再由纯化蛋白的特征筛选分离其基因。该方法被证明非常困难,因为植物细胞中 P450 的含量很低,要获得一定数量的纯化 P450 蛋白非常不易。另一途径是用 P450 基因探针方法,这是更直接的鉴定 P450 基因的方法,但该方法无法提供有关 P450 功能的信息。近来,人们认识到还可以利用缺失某一 P450 催化反应的突变体(表 7.3),先克隆与这些缺失反应相关的基因,再根据突变体互补的原理鉴定基因的功能。在某些情况下,P450 基因也通过差别筛选或差别显示(differential display)得到确定(Czernic *et al.*, 1996; Larkin, 1994; Nadeau *et al.*, 1996; Suzuki *et al.*, 1996; Vetter *et al.*, 1992),用该方法从大豆 *Glycine max* 的培养细胞中鉴定出可被甲基茉莉酸诱导的 P450 基因(CYP93A1)。用该基因克隆了同一基因家族的另一 P450 基因(CYP93A2),与 CYP93A1 具有 80% 相同性,但它对甲基茉莉酸处理没有响应,预示二者功能可能有所不同(Suzuki *et al.*, 1997)。差别筛选的另一例子是鉴定出蝶兰(*Phalaenopsis*)胚珠发育过程中特异性表达的 P450(CYP78A2)(Nadeau *et al.*, 1996),从玉米穗状雄花的 cDNA 文库中差别筛选出一未知功能的同一家族 P450(CYP78A1),CYP78A1 与 CYP78A2 具有 54% 相同性。CYP78A2 被认为可能在生物合成(花粉管发育所需)植物生长调节剂中起作用,但至今其功能还是个谜。另外一些 P450 从表达序列标签(EST)文库中鉴定(Cooker *et al.*, 1996; Newman *et al.*, 1994; Shen *et al.*, 1994)。

大多数植物的 P450 基因未被克隆,已克隆的基因的体内功能尚未知(表 7.2)。CYP71 是第一个从鳄梨(*Persea americana*)中皮层(mesocarp)中纯化至均质的植物 P450,它可以催化模式底物对-氯-N-甲基苯胺的 N-脱甲基作用,但它的内源性底物目前还不清楚。为弄清 CYP71 的体内功能,将 CYP71 转到酵母中表达,异源表达的 P450 表现出  $\rho$ -氯-N-甲基苯胺脱甲基作用(Bozak *et al.*, 1992),还可将橙花醇(nerol)和香叶醇(geraniol)转化为它们的 2,3- 和 6,7- 环氧化衍生物(Hallahan *et al.*, 1994)。但是,在鳄梨中皮层的提取液中既未检测到这些单萜底物及其反应产物。随着 CYP71A1 被克隆后,其他许多 P450 cDNAs 通过 PCR(Baltrusch *et al.*, 1997; Clark *et al.*, 1997; Courtney *et al.*, 1996; Frank *et al.*, 1996; Hutvagner *et al.*, 1997; Meijer *et al.*, 1993; Suzuki *et al.*, 1996; Udvardi *et al.*, 1994; O'keefe and Leto, 1989)和用 P450 探针在不太严格条件下杂交的方法来鉴定(Czernic *et al.*, 1996; Mangold *et al.*, 1994; Toguri *et al.*, 1993; Toguri and Tokugawa, 1994; Umemoto *et al.*, 1993),但这些方法依赖于对有关的 P450 基因和它们编码蛋白的一级结构的了解。

表 7.2 植物细胞色素 P450 克隆基因列表

名称	酶(功能)	植物种名	参考文献
CYP51	obtusifoliol 14 $\alpha$ -脱甲基酶	<i>Sorghum bicolor</i>	Bak <i>et al.</i> , 1998
CYP71A1	未知	<i>Persea americana</i>	Bozak <i>et al.</i> , 1990
CYP71A2	未知	<i>Solanum melongena</i>	Umemoto <i>et al.</i> , 1993
CYP71A3	未知	<i>Solanum melongena</i>	Umemoto <i>et al.</i> , 1993
CYP71A4	未知	<i>Solanum melongena</i>	Umemoto <i>et al.</i> , 1993
CYP71A5	未知	<i>Nepeta racemosa</i>	Clark <i>et al.</i> , 1997
CYP71A6	未知	<i>Nepeta racemosa</i>	Clark <i>et al.</i> , 1997
CYP71A10	苯基脲类羟基化或 N-脱甲基	<i>Glycin max</i>	Siminszky <i>et al.</i> , 1999
CYP71B1	未知	<i>Thlaspi arvense</i>	Udvardi <i>et al.</i> , 1994
CYP71B2-6	未知	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Mizutani <i>et al.</i> , 1998
CYP71B7	未知	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Maughan <i>et al.</i> , 1997
CYP71C1	HBOA 合酶	<i>Zea mays</i>	Frey <i>et al.</i> , 1995; Frey <i>et al.</i> , 1997
CYP71C2	二氢吲哚-2-酮(indolin-2-one) 羟化酶	<i>Zea mays</i>	Frey <i>et al.</i> , 1995; Frey <i>et al.</i> , 1997
CYP71C3	HBOA-N-羟化酶	<i>Zea mays</i>	Frey <i>et al.</i> , 1995; Frey <i>et al.</i> , 1997
CYP71C4	二氢吲哚-2-酮合酶	<i>Zea mays</i>	Frey <i>et al.</i> , 1995; Frey <i>et al.</i> , 1997
CYP71D6	未知	<i>Solanum chacoense</i>	Hutvagner <i>et al.</i> , 1997
CYP71D7	未知	<i>Solanum chacoense</i>	Hutvagner <i>et al.</i> , 1997
CYP71D10	未知	<i>Glycine max</i>	Siminszky <i>et al.</i> , 1999
CYP71E1	蜀黍氯苷(dhurrin)的合成	<i>Sorghum bicolor</i>	Bak <i>et al.</i> , 1998
CYP72A1	未知	<i>Catharanthus roseus</i>	Mangold <i>et al.</i> , 1994; Vetter <i>et al.</i> , 1992
CYP73A1	肉桂酸-4-羟化酶	<i>Helianthus tuberosus</i>	Teutsch <i>et al.</i> , 1993
CYP73A2	肉桂酸-4-羟化酶	<i>Phaseolus aureus</i>	Mizutani <i>et al.</i> , 1993
CYP73A3	肉桂酸-4-羟化酶	<i>Medicago sativa</i>	Menting <i>et al.</i> , 1994

续表

名称	酶(功能)	植物种名	参考文献
CYP73A4	肉桂酸-4-羟化酶	<i>Catharanthus roseus</i>	Hotze <i>et al.</i> , 1995, Meijer <i>et al.</i> , 1993
CYP73A5	肉桂酸-4-羟化酶	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Bell-Lelong <i>et al.</i> , 1997; Mizutani <i>et al.</i> , 1997
CYP73A9	肉桂酸-4-羟化酶	<i>Pisum sativum</i>	Frank <i>et al.</i> , 1996
CYP73A10	肉桂酸-4-羟化酶	<i>Petroselinum crispum</i>	Logemann <i>et al.</i> , 1995
CYP73A12	肉桂酸-4-羟化酶	<i>Zinnia elegans</i>	Ye <i>et al.</i> , 1996
CYP73A13	肉桂酸-4-羟化酶	<i>Populus tremuloides</i>	Ge and Chiang, 1996
CYP73A16	肉桂酸-4-羟化酶	<i>Populus kitakamiensis</i>	Kawai <i>et al.</i> , 1996
CYP73A?	肉桂酸-4-羟化酶	<i>Populus kitakamiensis</i>	Kawai <i>et al.</i> , 1996
CYP73A?	肉桂酸-4-羟化酶	<i>Populus kitakamiensis</i>	Kawai <i>et al.</i> , 1996
CYP74A1	丙二烯氧化物合酶(AOS)	<i>Linum usitatissimum</i>	Song and Brash, 1991
CYP74A2	橡胶颗粒蛋白	<i>Parthenium argentatum</i>	Pan <i>et al.</i> , 1995
CYP74A3	丙二烯氧化物合成酶(AOS)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Laudert <i>et al.</i> , 1996
CYP74B	脂肪酸氢过氧化物裂解酶	<i>Capsicum annuum</i>	Matsui <i>et al.</i> , 1996
CYP75A1	类黄酮3',5'-羟化酶	<i>Petunia hybrida</i>	Holton <i>et al.</i> , 1993, Teutsch <i>et al.</i> , 1993
CYP75A2	类黄酮3',5'-羟化酶	<i>Solanum melongena</i>	Toguri and Tokugawa, 1994
CYP75A3	类黄酮3',5'-羟化酶	<i>Petunia hybrida</i>	Holton <i>et al.</i> , 1993
CYP75A4	类黄酮3',5'-羟化酶	<i>Geniana triflora</i>	Tanaka <i>et al.</i> , 1996
CYP76A1	未知	<i>Solanum melongena</i>	Toguri <i>et al.</i> , 1993
CYP76A2	未知	<i>Solanum melongena</i>	Toguri <i>et al.</i> , 1993
CYP76B1	外源物质,模式底物	<i>Helianthus tuberosus</i>	Robineau <i>et al.</i> , 1998
CYP76C1		<i>Arabidopsis thaliana</i>	Mizutani <i>et al.</i> , 1998
CYP77A1	未知	<i>Solanum melongena</i>	Toguri <i>et al.</i> , 1993
CYP77A2	未知	<i>Solanum melongena</i>	Toguri <i>et al.</i> , 1993
CYP77A3	未知	<i>Glycin max</i>	Siminszky <i>et al.</i> , 1999
CYP78A1	未知	<i>Zea mays</i>	Larkin, 1994
CYP78A2	未知	<i>Phalaenopsis sp.</i>	Nadeau <i>et al.</i> , 1996
CYP78A3	未知	<i>Glycin max</i>	Siminszky <i>et al.</i> , 1999
CYP79	酪氨酸-N-羟化酶	<i>Sorghum bicolor</i>	Koch <i>et al.</i> , 1995
CYP80	小檗宁合酶	<i>Berberis stolonifera</i>	Kraus and Kutxhan, 1995
CYP81E1	异黄酮-2'-羟化酶	<i>Glycyrrhiza echinata</i>	Akashi <i>et al.</i> , 1998a
CYP82	未知	<i>Pisum sativum</i>	Frank <i>et al.</i> , 1996
CYP82C1	未知	<i>Glycin max</i>	Siminszky <i>et al.</i> , 1999
CYP83	未知	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Chapple, 1995
CYP83A1	未知	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Mizutani <i>et al.</i> , 1998

续表

名称	酶(功能)	植物种名	参考文献
CYP83B1	未知	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Mizutani <i>et al.</i> , 1998
CYP83D1	未知	<i>Glycin max</i>	Siminszky <i>et al.</i> , 1999
CYP84	阿魏酸-5-羟化酶	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Meyer <i>et al.</i> , 1996
CYP85	未知(brassinosteroid 合成酶?)	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Bishop <i>et al.</i> , 1996
CYP86		<i>Arabidopsis thaliana</i>	Benveniste and Durst, 1995
CYP88	未知(赤霉素合成酶?)	<i>Zea mays</i>	Winkler and Helentjaris, 1995
CYP89A2	未知	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Courtney <i>et al.</i> , 1996
CYP90	Cathasterone-23-羟化酶	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Szekeres <i>et al.</i> , 1996
CYP91A1	未知	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Mizutani <i>et al.</i> , 1998
CYP92A2	未知	<i>Nicotiana tabacum</i>	Czernic <i>et al.</i> , 1996
CYP92A3	未知	<i>Nicotiana tabacum</i>	Czernic <i>et al.</i> , 1996a
CYP93A1	未知	<i>Glycine max</i>	Suzuki <i>et al.</i> , 1996
CYP93A2	未知	<i>Glycine max</i>	Suzuki <i>et al.</i> , 1997
CYP93B1	(2S)-黄烷酮-2-羟化酶	<i>Glycyrrhiza echinata</i>	Mizutani <i>et al.</i> , 1998
CTP93B2	黄酮合酶 II	<i>Gerbera hybrid</i>	Akashi <i>et al.</i> , 1998b
CYP93C1		<i>Glycine max</i>	Martens and Forkman, 1999
CYP97B1	未知	<i>Pisum sativum</i>	Siminszky <i>et al.</i> , 1999
CYP97B2	未知	<i>Glycine max</i>	Baltrusch <i>et al.</i> , 1997
CYP98	未知	<i>Sorghum bicolor</i>	Siminszky <i>et al.</i> , 1999
CYP98A2	未知	<i>Glycine max</i>	Bak <i>et al.</i> , 1998
CYP99	未知	<i>Sorghum bicolor</i>	Siminszky <i>et al.</i> , 1999
CYP703A1	月桂酸加单氧酶	<i>Petunia hybrid</i>	Bak <i>et al.</i> , 1998

表 7.3 缺失 P450 催化反应的突变体(Chapple, 1998)

突变体	种名	缺失酶	参考文献
b	<i>Matthiola incana</i>	类黄酮-3'-羟化酶	Forkmann <i>et al.</i> , 1980
bx3	<i>Zea mays</i>	二氢卟啉-2-酮羟化酶	Frey <i>et al.</i> , 1997
cpd	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Cathasterone-23-羟化酶	Szekeres <i>et al.</i> , 1996
dwarf	<i>Lycopersicon esculentum</i>	未知	Bishop <i>et al.</i> , 1996
dwarf3	<i>Zea mays</i>	GA12-13-羟化酶	Winkler and Helentjaris, 1995
eos	<i>Antirrhinum majus</i>	类黄酮-3'-羟化酶	Forkmann and Stotz, 1981.
fah1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	阿魏酸-5-羟化酶	Chapple <i>et al.</i> , 1992; Meyer <i>et al.</i> , 1996
ga3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	贝壳杉烯醇羟化酶	Finkelstein and Zeevaart, 1994
hf1, hf2	<i>Petunia hybrida</i>	类黄酮-3',5'-羟化酶	Holton <i>et al.</i> , 1993
ht1, ht2	<i>Petunia hybrida</i>	类黄酮-3'-羟化酶	Doodeman <i>et al.</i> , 1982; Tabak <i>et al.</i> , 1978
p	<i>Verbena hybrida</i>	类黄酮-3',5'-羟化酶	Beale <i>et al.</i> , 1940
tt7	<i>Arabidopsis thaliana</i>	类黄酮-3'-羟化酶	Shirley <i>et al.</i> , 1995

植物 P450 从功能意义上可以分为两大类型。一是具生物合成功能的 P450, 另一类

为代谢解毒的 P450。生物合成有关的 P450 在木质素中间物、植物激素、甾醇、萜类、黄酮类、异黄酮和呋喃香豆素的合成中起重要作用。解毒有关的 P450 可以催化外源化合物如除草剂变成非毒性产物。还有些 P450 可能活化某些无毒性的物质如前除草剂 (pro-herbicide) 成为具有毒性的除草剂 (Schuler, 1996)。

## 7.1 生物合成酶

### 7.1.1 芳丙烷类 (phenylpropanoid) 生物合成

苯丙烷的生物合成中已报道的 P450 催化反应超过 16 个 (Werck-Reichart, 1995)。从苯丙氨酸 4-香豆酰辅酶 A。经三个催化步骤形成的代谢物进入苯丙烷代谢途径 (图 7.1)，其中第二步反应由肉桂酸-4-羟化酶 (C4H) 催化，该酶是 P450。由于 C4H 催化反应的中心地位，C4H 活性几乎存在于所有植物中，与其他 P450 活性相比具有相对较高的活性。因此，C4H 成为第一个鉴定的 P450 (Russell, 1971; Russell and Conn, 1967)，也是惟一的一个从许多植物中和细胞类型中鉴定的活性。

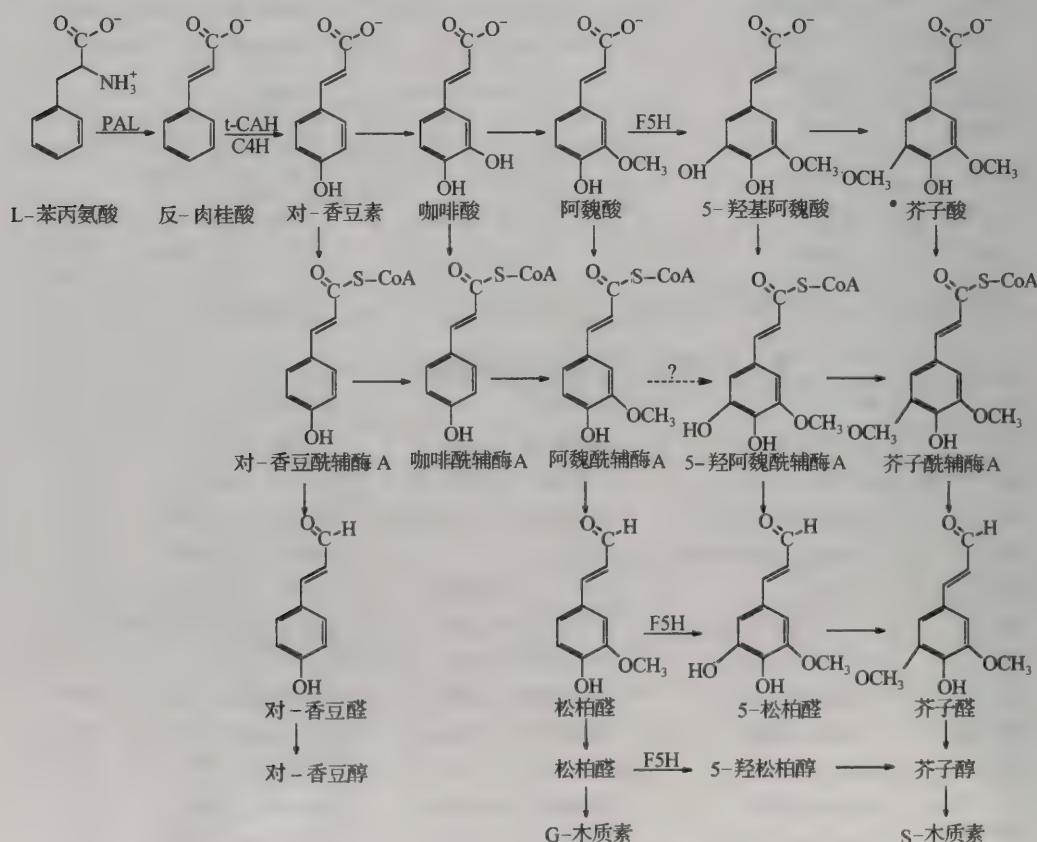


图 7.1 芳丙烷类化合物的代谢途径

C4H 的功能是反式-肉桂酸的羟基化,底物来源于苯丙氨酸代谢产物。C4H 自发现以来,得到了广泛的研究,因为它参与的苯丙烷代谢途径产生大量的重要代谢物包括木质素、黄酮类、羟基肉桂酸酯、木脂素类(lignans)、二苯乙烯(stilbenes)以及一些其他次生性代谢物如植物防御化合物(异类黄酮、香豆素、呋喃香豆素)。

C4H 蛋白的分离得益于相分配技术的发展,在高浓度的甘油存在时,将在经增溶的微粒体制备液中的 P450 提取到富含去污剂的分配相中(Werck-Reichhart *et al.*, 1991)。利用这一技术,从菊芋(*Helianthus roseus*)(Gabriac *et al.*, 1991),绿豆(*Phaseolus aureus*)(Mizutani *et al.*, 1993)中纯化了 C4H,其对应的 cDNAs(Mizutani *et al.*, 1993a; Teutsch *et al.*, 1993)也用肽序列及蛋白抗体(Werck-Reichhart, 1993)得到了分离鉴定。随后,从许多其他植物中分离出 C4H 的 cDNAs 或基因组克隆(表 7.2)。C4H 归为 CYP73 家族,是典型的“A 组”P450。从异源表达的属于 CYP73 家族(CYP73A1 – CYP73A5)P450 的实验表明,它们具有肉桂酸 4-羟化酶活性。已经分离的 CYP73 P450 在氨基酸水平上彼此有 75%~90% 相似性,是否所有 CYP73 家族成员都具有相同的反应活性还不清楚(Mizutani, 1998)。

C4H 活性及其基因表达受许多因子的调控。C4H 酶活性可因受伤(Benveniste *et al.*, 1977)和接触金属离子(Reichhart *et al.*, 1979)被诱导。调控可能在转录水平上(Batard *et al.*, 1997; Bell-Lelong *et al.*, 1997; Frank *et al.*, 1996; Mizutani *et al.*, 1993)。病原物攻击可以诱导 C4H mRNA (Buell and Somerville, 1995)。另外,C4H 的表达调控时空方式与该酶在木质化过程中的功能相一致。

C4H 具有很高的底物特异性(Pierrel *et al.*, 1994),对肉桂酸的  $K_m$  值低( $4\mu\text{mol/L}$ ),转换数非常高(400/min)。该酶对许多能被 P450 代谢的植物产物无羟基化作用(Pierrel *et al.*, 1994),但对一些外源物质具有低效率的脱烷基或羟基化作用。这些数据说明,C4H 不像代谢外源物质的酶,它具有高效性和底物特异性(Urban *et al.*, 1994)。

C4H 的编码全长 cDNA 已从菊芋(Teutsch *et al.*, 1993),绿豆(Mizutani *et al.*, 1993),苜蓿(*Medicago sativa*)(Fahrendorf and Dixon, 1993)。从向日葵属(*Helianthus*)植物中分离的 P450 被定名为 CYP73A1。

木质素生物合成支路,对-肉桂酸被转化为咖啡酸(coffeate),随后变成阿魏酸(ferulate),阿魏酸羟基化生成 5-羟基阿魏酸也是由 P450 介导,称阿魏酸 5-羟化酶(F5H)(Grand, 1984)。5-羟基阿魏酸的甲基化作用是通过 O-甲基转移酶催化完成,产生芥子酸(sinapate)。芥子酸、对-香豆酸和阿魏酸经活化,形成各自的 CoA 硫酯,随后被还原形成羟基肉桂醇(苯丙烯醇)(hydroxycinnamyl alcohol),构成木质素这一代谢途径。F5H 活性控制 5-羟基阿魏酸与阿魏酸的比率,由此决定芥子醇(sinapyl alcohol)与松柏醇(coniferyl alcohol)的比率,F5H 酶因此决定木质素中不同单体类型的相对丰度。

F5H 离体活性的报道很少(Grand, 1984),它的作用是将阿魏酸转化为 5-羟基阿魏酸(图 7.1)。F5H 突变体已在拟南芥(*Arabidopsis*)中发现(表 7.3),fah1 突变体不能合成芥子酰苹果酸酯(sinapoylmalate)这种 *Arabidopsis* 中主要的可溶性苯丙烷次生性代谢物。由于其叶片缺乏芥子酰苹果酸酯,fah1 突变体在紫外光下显示暗红的叶绿素荧光不同于野生种类的蓝色荧光(Chapple *et al.*, 1992)。利用这种可视性的筛选方法,fah1 的 T-DNA 尾等位基因被确定并用于克隆编码 F5H 的基因,克隆基因的性质通过突变体

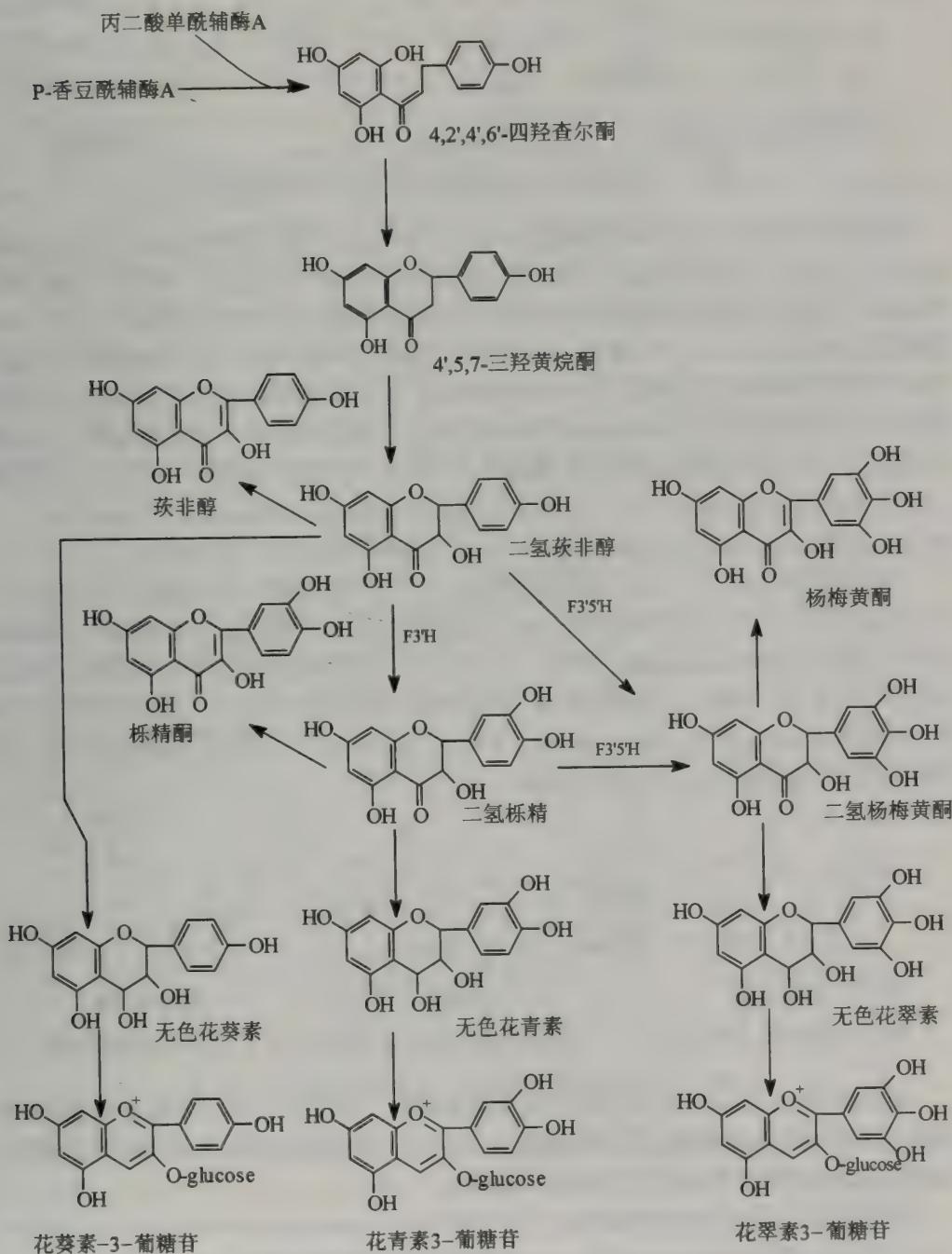
表型的互补得到证实(Meyer *et al.*, 1996)。F5H 基因的损害,使 fah1 突变体不积累芥子酰衍生的丁香基(syringyl)木质素(Chapple *et al.*, 1992)。野生的 *Arabidopsis* 丁香基单位仅构成多聚体的 20%,且仅积累在叶轴(rachis)的硬化薄壁组织(parenchyma)中。在花椰菜花叶病毒 35S 启动子指导下,F5H 基因的表达可以消除木质素单体贮量(dopository)的组织特异性,丁香基含量上升 50%。这些结果表明,F5H 的表达与 *Arabidopsis* 中木质素生物合成的定量调控和发育调控有关。如用 *Arabidopsis* C4H 启动子控制,F5H 基因的表达效率更高,产生丁香基含量超过 90% 的木质素。可见 P450 的启动子以及 F5H 的编码序列可用在生物技术应用方面(Meyer *et al.*, 1996)。

为进一步了解 F5H, Humphreys 等(1999)将 F5H 基因在酵母中表达。发现 F5H 不仅催化阿魏酸生成 5-羟基阿魏酸,它还以松柏醛(coniferaldehyde)和松柏醇(coniferyl alcohol)为底物,且后两种底物的  $K_m$  值比阿魏酸低 3 个数量级,预示在木质化组织中丁香基单体可能来源于它们对应的邻-甲氧苯基(guaiacyl),经羟基化和随后的甲基化作用形成,从而提出了木质素合成的更新途径(图 7.1)。

黄酮类化合物中占优势的一个亚类是花色素苷(Holton and Cornish, 1995; Forkmann, 1991)。通过苯丙烷类途径中的花色素苷生物合成支路,由前体  $\rho$ -香豆酸衍生不同种类的花色素苷,P450 特别丰富(图 7.2)。在这一系列反应中,4-香豆酰基辅酶 A 经查耳酮(chalcone)合酶(CHS)形成四羟基查耳酮。四羟基异构化生成 4',5,7-三羟黄烷酮(naringenin),4',5,7-三羟黄烷酮转化为二-氢莰非醇(dihydrokaempferol, DHK)是两个不同 P450 加单氧酶系的底物。由类黄酮 (flavonoid)3'-羟化酶(F3'H)在 3' 位置催化 4',5,7-三羟黄烷酮或 DHK 的羟基化(Stotz *et al.*, 1985),类黄酮 3',5'-羟化酶(F3',5'H)催化 DHK 或二氢栎精(dihydroquercetin, DHQ)成二氢杨梅黄酮(dihydromyricetin, DHM)。该两种 P450 羟化酶可以催化多种相关底物,如 DHK 和 DHQ。相对而言其他植物 P450 如 t-CAH 和随后提到的补骨脂素(psoralen)5-单加氧酶具有较高的底物特异性。

与阿魏酸 5-羟基化酶(苯丙烷类合成途径的木质素生物合成支路)一样,花色素苷支路的流量受几个 P450 的比率和活性的调控,如花翠素(delphinidin)、花青素(cyanidin)的比例随类黄酮 3'-和 3',5'-羟化酶存在与否而变化。当两种 P450 都存在时(如在碧冬茄 *Petunia hybrida* 中),花翠素衍生物占优势,而仅有 F3'H 活性存在时,花青素衍生物占优势(Holton and Cornish, 1995)。

编码类黄酮-3',5'-羟化酶(F-3',5'-H)的基因是第一个克隆的植物 P450 基因,是从碧冬茄 *Petunia hybrida* 中,用生物化学和遗传学方法(Holton *et al.*, 1993)分离克隆的,定为 P450CYP75。F-3',5'-H 催化 4',5,7-三羟基黄烷酮(naringenin)逐步转化为圣草酚(eriodictyol)和五羟基黄烷酮(pentahydroxyflavanone)(图 7.3)以及催化对应的二氢莰非醇的羟基化作用转化为二氢栎精(dihydroquercetin)和二氢杨梅黄酮(dihydromyricetin)(图 7.3, 7.4, Menting *et al.*, 1994; Stotz and Forkmann, 1981)。F-3',5'-H 反应的产物是花色素生物合成的中间体。二-或三-羟基化衍生物的葡萄糖苷花青素(cyanidin)和翠雀素(delphinidin)是碧冬茄(*Petunia*)和许多其他植物的紫-蓝(purple-blue)花的色素。利用 F-3',5'-H 操纵花色的可能性是分离其对应基因的动力(Holton, 1995)。



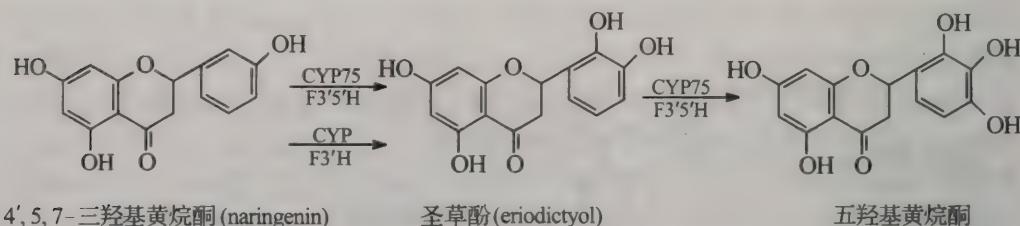


图 7.3 类黄酮-3',5'-羟化酶(F-3',5'-H)催化的反应

碧冬茄中, *Hf1* 和 *Hf2* 基因座编码 F-3',5'-H, *Hf1/Hf2* 双突变体缺乏由二氢杨梅黄酮衍生的花色素, 其花的颜色不同于野生种(Stotz and Forkmann, 1981)。根据 P450 血红素结合生成的保守区域设计的引物得到 PCR 产物库, 其中两个克隆在 *hf1/hf2* 双突变体花冠中制备的 RNA 中无可识别的转录物。该两个“基于突变体的克隆策略”分离的 cDNA, 彼此具有 93% 相同性。*Hf1* 具有比 *Hf2* 更大的影响花颜色表达的效应, 因为 *Hf1* 可以同时影响冠檐 (corolla limb) 和冠筒 (corolla tube) 而 *Hf2* 仅能影响冠檐。异源表达 (酵母) 证明, 该克隆编码的蛋白可以催化 F-3',5'-H 反应。其他 F-3',5'-H 的核酸序列已在矮牵牛 (Toguri *et al.*, 1993), 茄子 (*Solanum melongena*) (Toguri *et al.*, 1993a), 龙胆 (*Gentiana triflora*) (Tanaka *et al.*, 1996) 中也分离了其 cDNA。

在此要提到的是, F-3',5'-H 在生物化学上不同于类黄酮 3'-羟化酶(F-3'-H), F-3'-H 分别将 4',5,7-三羟基黄烷酮 (naringenin) 和二氢莰非醇转化为圣草酚和二氢栎精 (图 7.3 和 7.4, Menting *et al.*, 1994)。F-3',5'-H 在其活性部位可以容纳双羟基化的 B 环, 但 F-3'-H 不能。已从矮牵牛和 *Arabidopsis* 中获得缺失 F-3'-H 活性的突变体 (Doodeman *et al.*, 1982; Shirley *et al.*, 1995; Tabak *et al.*, 1978), 由此可以用基于突变体克隆方法分离 F-3'-H 基因 (Meyer *et al.*, 1996)。

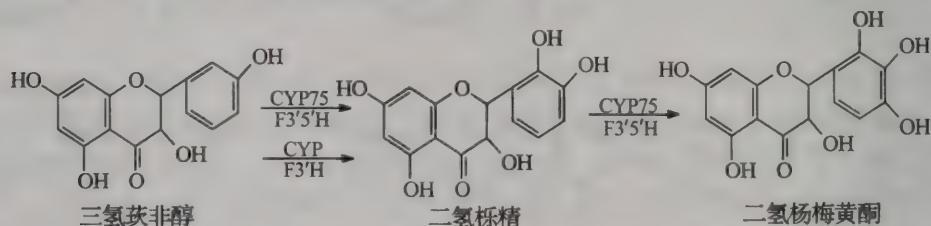


图 7.4 类黄酮 3'-羟化酶(F-3'-H)与类黄酮-3',5'-羟化酶(F-3',5'-H)催化反应特异性

异类黄酮 (isoflavanoids) 是天然存在的类黄酮的一个亚类, 它几乎分布于所有的豆科植物中, 并参与豆科植物对植物病原微生物的防御。异类黄酮衍生的化合物在大豆根与细菌形成固氮根瘤菌的共生关系中也十分重要。

从苯丙烷共同途径的终产物 4-香豆酰辅酶 A (4-coumaroyl CoA) 开始, 已知 4 个 P450 介导了大豆 *Glycine max* 中 glyceollin 的合成, 即异黄酮合酶 (Isoflavone synthase), 7,4'-二羟基异黄酮 2'-羟化酶 (daidzein 2'-hydroxylase), 3,9-二羟紫檀 6 $\alpha$ -羟化酶 (3,9-dihydroxyptero-carpan 6 $\alpha$ -hydroxylase) 及环化酶 (cyclase) (Kochs and Grisebach, 1986; Hagmann *et al.*, 1984; Welle and Grisebach, 1988)。在鹰嘴豆 (*Cicer arietinum*) 中, 两种不同的 P450 即异黄酮 2'-羟化酶 (isoflavone 2'-hydroxylase; I'2H) 和异黄酮 3'-羟化酶

(isoflavone 3'-hydroxylase) 分别将 7-羟-4'-甲氧异黄酮 (formononetin) 转化为 medicarpin 和高丽槐素 (maackiain)。其中 I2'H 被报道对 4'-甲氧异黄酮 [7-羟-4'-甲氧异黄酮和鸡豆黄素 (biochanin A)] 具有特异性, 而对 4'-羟基类似物 (7,4'-二羟基异黄酮和 5,7,4'-三羟基异黄酮) 很少发生羟基化作用 (Hinderer *et al.*, 1987; Clemens *et al.*, 1993)。

从甘草 *Glycyrrhiza echinata* 中分离了一编码异黄酮 2'-羟化酶 (I2'H) 的基因, 定名为 CYP81E1 (Akashi *et al.*, 1998a)。超量表达 CYP81E1 的酵母细胞微粒体可以催化异黄酮 (7,4'-二羟基异黄酮和 7-羟-4'-甲氧异黄酮) 的羟基化作用, 分别产生 2'-羟基异黄酮 (2'-羟基 7,4'-二羟基异黄酮和 2'-羟基 7-羟-4'-甲氧异黄酮)。首次证明了 CYP81E1 是参与豆科植物中异类黄酮衍生的抗微生物化合物合成的 2'-羟化酶。

从甘草中分离的另一 P450 基因 CYP93B1, 通过在昆虫细胞中表达该基因的微粒体 P450 可以催化 (2S)-7,4'-二羟基黄烷酮 (liquiritigenin) 和 (2S)-4',5,7-三羟基黄烷酮 (naringenin) 分别形成 Licodione 和 2-羟基-naringenin。用酵母表达该基因得到的微粒体 P450 可以将圣草酚转化为毛地黄黄酮 (luteolin)。为此认为 CYP93B1 编码 (2S)-黄烷酮 2-羟化酶, 该酶以前被称为 licodione 合酶和黄酮合酶 II (图 7.5)。

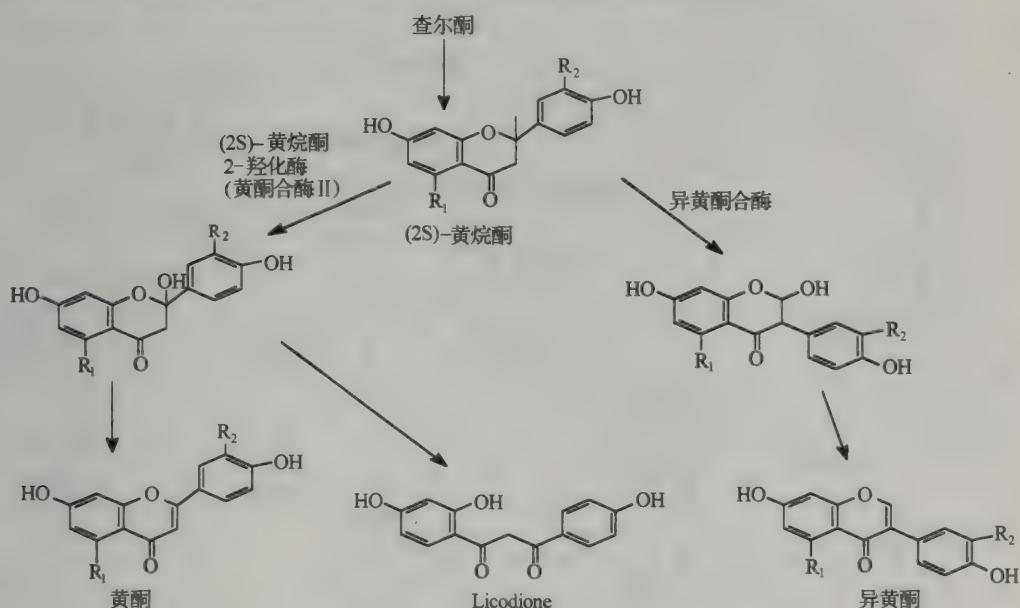


图 7.5 黄酮、异黄酮及 Licodione 的合成 (Akashi 等, 1998b)

Marten 和 Forkmann (1999) 从大丁草 *Gerbera hybrida* 中获得了一全长 cDNA, CYP93B2, 该基因只在具有显性等位基因 *fns*<sup>+</sup> 的株系中转录。在花发育过程中, CYP93B2 的转录水平与黄酮合酶 II 的活性以及黄酮的积累量相一致。由酵母表达的 CYP93B2 可以催化黄烷酮产生黄酮的反应。该基因被证明是黄酮合酶 II, 它与 CYP93B2 序列有 54% 相同性。

植物防御毒素的另一大类是呋喃香豆素, 其中 P450 参与了呋喃香豆素的生成 (图 7.6)。线型呋喃香豆素由香豆素的前体 7-羟基香豆素 (umbelliferone) 而来, 在香豆素核的 6,7 位置加上呋喃环。在大阿米 (*Ammi majus*) 和皱叶欧芹 (*Petroselinum crispum*)

中,两个P450即马米生合成酶(marmesin synthase)(Hammerski and Matern, 1988a)和补骨脂素(psoralen)合酶(Wendroff and Matern, 1986)起催化作用形成线型呋喃香豆素补骨脂素。香豆素核5-,8-位置的羟基化作用也是由P450催化的,分别为补骨脂素5-加氧酶和补骨脂素8-加氧酶(Matern *et al.*, 1988; Hammerski and Matern, 1988b)。产物分别是佛手酚(bergaptol)和花椒毒素(xanthotoxin)。这类羟基化产物在某些植物中是终产物(Murray *et al.*, 1982),但在大多数伞形科植物(umbelliferone)中,它们是O-甲基转移酶的底物,由此产生花椒毒素(8-甲氧基补骨脂素)和香柠檬烯(bergapten)(5-甲氧基补骨脂素(methoxypsoralen))。角型呋喃香豆素如当归根素(angelicin)和牛防风定(sphondin)也是防御毒素,它是通过在欧芹酚(ostheno1)的香豆素核的7,8-位加上呋喃环,在这合成途径中,也鉴定出P450的作用(赵剑 *et al.*, 1999)。

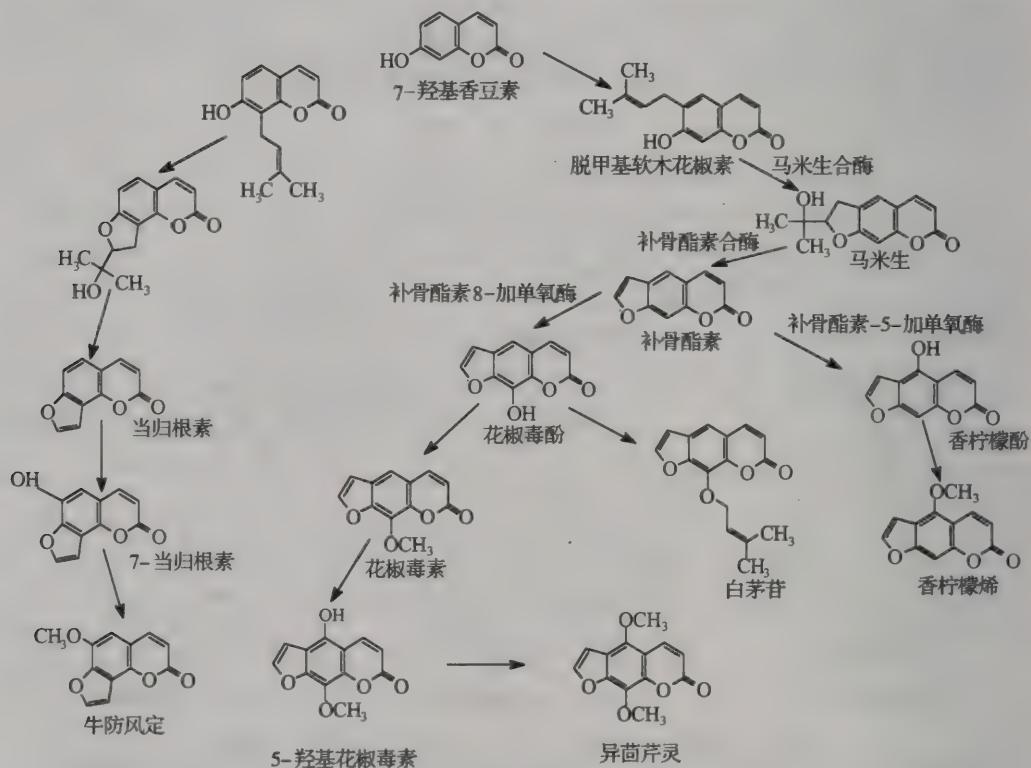


图 7.6 香豆素的生物合成

### 7.1.2 脂肪酸生物合成

植物的脂肪酸在形成蜡质和软木脂等保护结构中起一定作用,许多实验证明,P450参与脂肪酸的羟基化和环氧化。

脂肪酸代谢过程中,月桂酸羟化酶(lauric acid hydroxylase, LAH)催化短链(C10)和

中链(C12-C14)脂肪酸的羟基化(Salaun and Helvig, 1995)。在不同的植物中已鉴定出几种不同的 LAH,如链内月桂酸羟化酶 (in chain-lauric acid hydroxylase, IC-LAH) 在 C-8、C-9 和 C-10 羟基化,末端 C-12 羟基化酶( $\omega$ -lauric acid hydroxylase,  $\omega$ -LAH)在 12 位羟基化,以及( $\omega$ -1)-LAH 在 C-10 和 C-11 的羟基化(图 7.7)。这些酶系表现出严格地物种特异性,在同一植物种中,未发现有两个月桂酸羟化酶共存的现象(Zimmerlin and Durst, 1992)。近来的研究显示,一个月桂酸羟化酶(如来自救荒野豌豆 *Vicia sativa* 微粒体)具有  $\omega$ -羟基化月桂酸及其链内不饱和类似物以及环氧化 11-十二碳烯酸的能力(Weissbart 等, 1992),且顺式和反式不饱和类似物的羟基化效率相同。从碧冬茄中克隆了 CYP703A1,通过在酵母中表达,该血红素蛋白具有代谢月桂酸的能力。该基因在植物花发育的早期阶段表达,参与脂肪酸的加单氧作用(Imaishi *et al.*, 1999)。

碳链更长的油酸(C18, 18:1)的羟基化是由P450催化的,定名为 $\omega$ -油酸羟化酶( $\omega$ -OAH)(Pinot *et al.*, 1993),其产物为角质层(cuticle)的成分。月桂酸羟化酶和油酸羟化酶存在差异,各自的底物不抑制另一酶的活性。

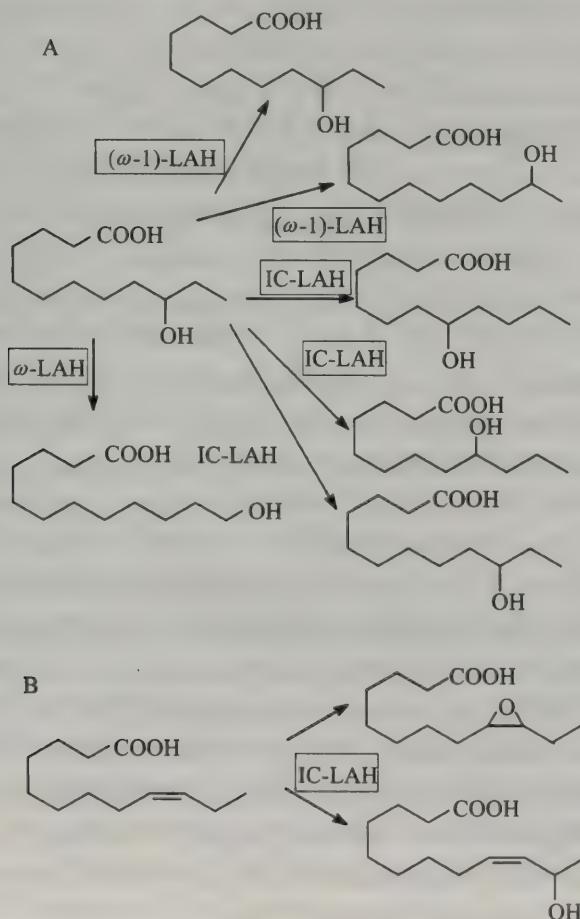


图 7.7 P450 催化的脂肪酸代谢

丙二烯氧化物是植物中非常重要的脂类中间体,在植物体内可以经酶催化转化为植物信号分子茉莉酸(Jasmonic acid)。催化 13-氢过氧亚油酸生成丙二烯氧化物的酶称为丙二烯氧化物合酶(AOS)。AOS 可以转化由脂肪氧合酶(lipoxygenase)催化衍生的脂肪酸氢过氧化物或不稳定的丙二烯氧化物(图 7.8)(Song *et al.*, 1991)。通过分析亚麻 *Linum usitatissimum* 的茉莉酸合成途径证明丙二烯氧化物合酶将 13-氢过氧化物转化为丙二烯氧化物是在无 NADPH-细胞色素 P450 还原酶或氧存在的条件下进行的。形成的丙二烯氧化物,再经丙二烯氧化物环化酶转化为环戊烯酮,后者最终转化为茉莉酸(Song *et al.*, 1993b)。催化 13-氢过氧化物成为丙二烯氧化物的 AOS 是许多植物特别是单子叶植物组织中占优势的 P450(Lau *et al.*, 1993)。

AOS 被认为是 P450,是根据它的光吸收特征。但该酶具有许多异常的特征,如不需氧,NADPH 和 P450 还原酶,表现出极高的转换数 70~80 000/min。根据从亚麻种子中纯化的 AOS 蛋白获得的肽序列信息,分离克隆了编码 AOS 的基因(Song *et al.*, 1993a),用来自亚麻序列的异源探针从 *Arabidopsis* 中克隆了一个同源基因(Laudert *et al.*, 1996)。与 P450 血红素结合域的保守序列比较,AOS 有一些明显的氨基酸残基替换。亚麻种子 AOS 显现 PSVANKQCAG 与 P450 的特征序列  $F \times \times G \times \times \times C \times G$  不同,存在 F-P 及 G-A 替换,而 *Arabidopsis* 序列中只有 F6P 替换。将这两个 AOS 序列与其他 P450 相比较,发现它们形成氧结合囊的区域也有所不同:保守的 F 被认为参与氧的活化(Von Wachenfeldt and Johnson, 1995),在 AOS 中被异亮氨酸(P)替换。AOS 表现出氨基酸替换、不依赖氧和 NADPH 及高转换数等特征,预示该酶不再在底物中插入分子氧而是催化氧化物的脱水作用。有趣的是,动物前列腺素(prostaglandin)合成中有一个类似的反应,其 P450(凝血噁烷合酶)也在保守 F 中发生 P 替换(Song *et al.*, 1993a)。

AOS cDNA 序列分析发现,AOS 蛋白的 N-末端氨基酸序列类似质体(plastid)或线粒体运送肽(transit peptide)(Leon *et al.*, 1995; Song *et al.*, 1993a)。菠菜的 AOS 活性与叶绿体膜相关联(Vick and Zimmerman, 1987),与以上研究结果有较好的一致性。用转基因马铃薯实验也发现亚麻 AOS 蛋白定位在叶绿体(Harms *et al.*, 1995)。AOS 催化茉莉酸生物合成中的限速步骤,在花椰菜花叶病毒(cauliflower mosaic virus)35S 启动子控制下,AOS 的超量表达,可以使茉莉酸的浓度增至 6~12 倍。AOS mRNA 在 *Arabidopsis* 可因受伤而被高度诱导,在受伤 1h 内 mRNA 与茉莉酸含量平行增加(Laudert *et al.*, 1996)。亚油酸的含量和脂肪氧化酶的活性并不影响未受伤植物体中的茉莉酸生物合成。

AOS 是许多植物器官如郁金香鳞茎(tulip bulb)(Lau *et al.*, 1993)中主要的 P450。最近证明,在灰白银胶菊(*Parthenium argentatum*)中的橡胶颗粒蛋白(rubber particle protein, RPP)也是 AOS(Pan *et al.*, 1995)。这一发现出人意料,因为 RPP 构成与橡胶颗粒相连的蛋白的 50%。但这种蛋白被纯化、其对应基因被克隆后,发现它与亚麻 AOS 有 65% 相同性,并表现出 AOS 活性。与亚麻 AOS 不同,RPP 在对应于 P450 氧结合囊中区域有 T→I 替换。但 RPP 不含质体运送序列,缺乏这一靶定肽(targeting peptide)允许该蛋白与橡胶颗粒相连。RPP 蛋白的功能尚不明确。

氢过氧化物裂解酶(HPO 裂解酶)也利用由脂肪氧合酶产生的不饱和脂肪酸的氢过氧化物为底物。它与 AOS 不同的是 HPO 裂解酶断裂邻近过氧化氢功能基团的 C—C 键(图 7.7)。形成的醛及其被还原形成的醇在植物的相互作用中发挥作用,它们构成果实

和蔬菜挥发物成分。Shibata 等(1995)从青椒果实中纯化了两种 HPO 裂解酶同工酶, 从其吸收光谱分析是血红蛋白(Shibata *et al.*, 1995a)。从其编码基因来看, 该酶是 P450 (Matsui *et al.*, 1996)。像 AOS 一样, HPO 裂解酶在保守的氧结合区的苏氨酸被异亮氨酸替代, 其血红素结合结构域的序列也与 P450 的共有序列不同。该酶与 AOS 具有 40% 相同, 它与 AOS 具有不寻常的氨基酸替代, 其活性不依赖于氧和 NDAPH, 且都利用相同的氢过氧化脂肪酸为底物。

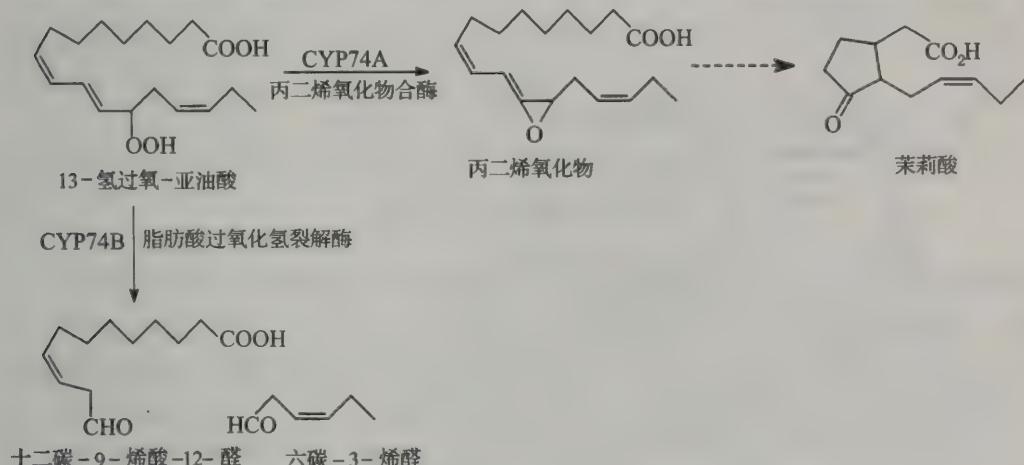


图 7.8 脂肪酸过氧化物的代谢

### 7.1.3 菲类的生物合成 (terpenoid biosynthesis)

菲类是一大类天然化合物, 包括激素如赤霉素(gibberellin)、脱落酸(abscisic acid)、光合色素如类胡萝卜素(carotenoids)、植物防御物质、电子载体(electron carriers)以及结构膜成分(McGravey and Croteau, 1995), P450 参与许多菲类物质的合成。

#### 7.1.3.1 单萜

单萜类衍生物的合成中, 柠烯的羟基化由 P450 催化(图 7.9A), 羟基化可以发生在环上 C-3 和 C-6 或侧链 C-7 上。柠烯羟化酶作用于柠烯, 其羟基化部位表现出植物种的特异性。辣薄荷(*Mentha piperita*), 留兰香(*Mentha spicata*)和白苏(*Perilla frutescens*)分别在 C-3, C-6, C-7 位置发生羟基化(Karp *et al.*, 1990)。这种位置的特异性(re-giospecificity)有别于土壤微生物的柠烯羟化酶(Dhavalikar 和 Bhattacharyya, 1996; Rama 和 Bhattacharyya, 1977a; Rama 和 Bhattacharyya, 1977b), 土壤微生物羟基化作用可以在 C-4, C-6 和 C-7 位置, 具有较宽程度的特异性(Dhavalikar 和 Bhattacharyya, 1996; Rama 和 Bhattacharyya, 1977a; Rama 和 Bhattacharyya, 1977b)。另一种单萜物质(+)冬青油烯(sabinene), 在撒尔维亚(*Salvia officinalis*)(Karp *et al.*, 1987)中由 P450 介导的羟基化也表现出高度的选择性, 它对(+)冬青油烯的异构体[内环化(-)- $\alpha$ -侧柏烯(thujene)]和另一单萜(-)- $\beta$ -蒎烯不起作用。

长春花(*Catharanthus roseus*)苗及其培养细胞中单萜类吲哚生物碱以及假荆芥

(*Nepeta racemosa*)吲哚生物碱的生物合成中,单萜烯醇(香叶醇和橙花醇)转化为 10-羟基衍生物是由香叶醇/橙花醇 10-羟化酶催化(图 7.9B, Madyastha *et al.*, 1976; Meijer *et al.*, 1993a; Meijer *et al.*, 1993; Hallahan *et al.*, 1994),羟基化部位在 C-10。而在鳄梨的主要的 P450,具有对-氯-N-甲基苯胺去甲基活性(O'Keefe and Leto, 1989),可以使香叶醇和橙花醇在 2,3-和 6,7-位置上发生环氧化(Hallahan *et al.*, 1994),可见该 P450 与产生生物碱植物中的香叶醇/橙花醇 10-羟化酶有相同的底物,但其作用部位不同,表现为环氧化酶作用。

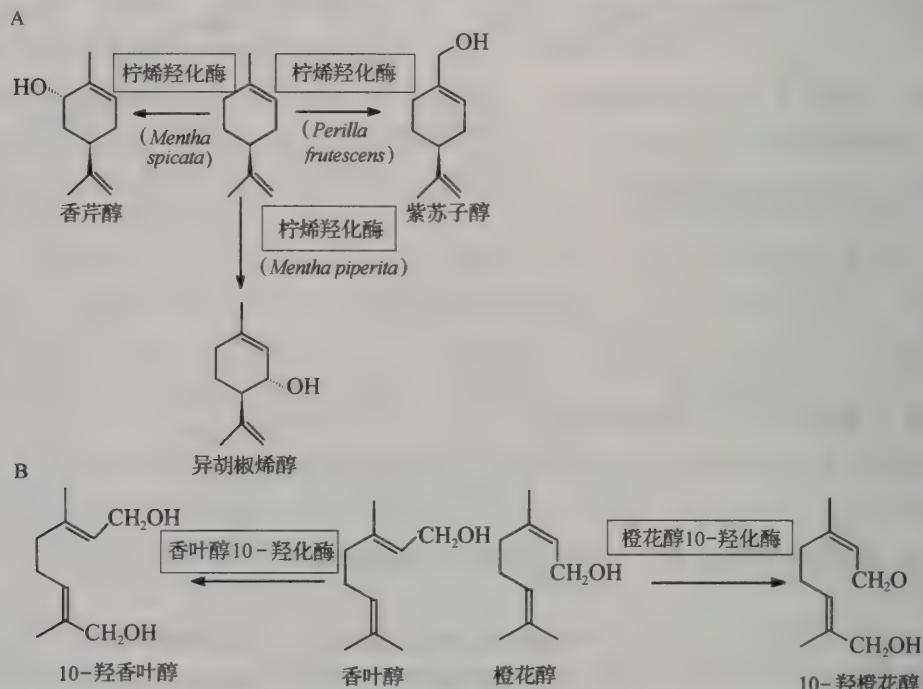


图 7.9 P450 催化的单萜的代谢

在巨冷杉 (*Abies grandis*) 中含油树酯(oleoresins)的合成中,异戊间二烯化合物的前体牻牛儿焦磷酸(geranyl phosphate)首先被转化为牻酸二烯(abietadiene),再转化为松香酸的过程中,有两种 P450 起作用即牻酸二烯羟化酶和牻酸二烯醇(abietadienol)羟化酶。松香酸是该种植物的主要树脂酸,树酯的合成是该植物防御昆虫侵害的主要机制,其中的两种 P450 活性可因受伤而高度诱导。

### 7.1.3.2 双萜

赤霉素(GA)是重要的植物生长调节剂,其生物合成过程为由 ent-贝壳杉烯(kaurene)  $\rightarrow$  ent-贝壳杉烯醇(kaurenol)  $\rightarrow$  ent-贝壳杉烯醛(kaureenal)  $\rightarrow$  ent-贝壳杉烯酸(kaurenoic acid)  $\rightarrow$  ent-7 $\alpha$ -羟基贝壳杉烯酸等 4 个连续的步骤都是由 P450 催化的(Graebe, 1987; Mihaliak *et al.*, 1993; Hedden and Kamiya, 1997),前三个步骤都由贝壳杉烯氧化酶催化,后一步骤由贝壳杉烯酸羧化酶催化(Graebe, 1987; Jennings *et al.*, 1993)(图 7.10)。以上四个步骤在植物[如筍瓜 (*Cucurbita maxima*), 豌豆 (*Pisum*

*sativum*), 玉米(*Zea mays*)和稻恶苗赤霉(*Gibberella fujikuroi*)中相同, 在形成 ent-7 $\alpha$ -羟基贝壳杉烯酸后, 真菌和植物的代谢反应分化, 但两者都包含有 P450 介导的反应, 如豌豆中赤霉素的生物合成途径中, P450 还介导 GA12-醛  $\rightarrow$  GA12  $\rightarrow$  GA53 的转化 (Graebe, 1987)。



图 7.10 赤霉素的生物合成

用遗传学方法, 把表型矮小的 GA 缺失植物用于克隆“非-P450”的 GA 生物合成基因座 (Chiang *et al.*, 1995; Sun *et al.*, 1992), 由此已经克隆了一个 P450 编码基因。生物化学互补实验以及 GA 中间物分析表明玉米突变体 *dwarf 3* (*d<sub>3</sub>*) 缺失转化 GA12  $\rightarrow$  GA53 的 P450 (Winkler *et al.*, 1995)。D3 基因的产物为一个新的 P450 家族定名为 CYP88, 为非“A组”类型的 P450 (Durst and O'keeffe, 1995), 除在其氨基末端存在一个不完全的 27 氨基酸重复外, 其他序列有 P450 典型特征。该酶的功能尚未知。

在无外源 GA 存在下不发芽的 *Arabidopsis* 突变体中, 鉴定了 5 个影响 GA 生物合成的基因座 (*ga1* ~ *ga5*)。*ga3* 突变可能缺失特异性的贝壳杉烯醇 (kaurenol) 氧化酶 (Finkelstein and Zeevaart, 1994) 或多功能的贝壳杉烯 (kaurene) 氧化酶 (将贝壳杉烯  $\rightarrow$  贝壳杉烯酸) (Kende and Zeavaart, 1997), 这需待克隆 *GA3* 基因后进一步证实。

### 7.1.3.3 三萜

膜内甾醇无 14 $\alpha$ -甲基, 甾醇前体如动物和真菌羊毛脂甾醇 (lanosterol) 和植物的钝叶鼠曲草醇的脱甲基作用由 CYP51 家族的 P450 催化。

植物钝叶鼠曲草醇 14 $\alpha$ -羟化酶催化三个连续的氧化过程, 在甾醇核中引入一个双键。同时以甲酸的形式释放一个甲基碳。用玉米微粒体制备液的测定结果显示, 该酶具有很高的底物特异性, 它对羊毛脂甾醇以及一些结构十分类似的化合物都无催化活性 (Taton and Rahier, 1991)。该酶已从高粱 (*Sorghum bicolor*) 秧苗中纯化出 (Kahn *et al.*, 1996), 根据其多肽氨基酸序列数据设计简并 PCR 引物已克隆出其 cDNA (Bak *et al.*, 1997)。另外用 CYP81 作探针, 低严格 (low-stringency) 杂交从小麦中分离了 CYP51 (Cabello-Hurtact, 1997)。大肠杆菌表达 CYP51 与钝叶鼠曲草醇显示出类型 I 结合光谱特征, 而与羊毛脂甾醇无此特征, 这从分子水平上进一步体现出该酶具高的底物特异性 (Bak *et al.*, 1997)。

钝叶鼠曲草醇 14 $\alpha$ -脱甲基酶是一非“A组”的 P450, 也是第一个与其他植物 P450 无同源关系的酶。它的定名是 P450 命名法则的一个例外, 钝叶鼠曲草醇 14 $\alpha$ -脱甲基酶推定的氨基酸序列与酵母和大鼠的羊毛脂醇 14 $\alpha$ -脱甲基酶分别有 32% 和 36% 的相同性 (Bak

et al., 1997)。根据 40% 法则这些酶应分属 3 个 P450 家族, 但它们催化相似底物的相同类型的反应( $14\alpha$ -脱甲基), 且它们的氨基酸相同程度接近 40%。因此, 将羊毛脂甾醇  $14\alpha$ -脱甲基酶和钝叶鼠曲草醇  $14\alpha$ -脱甲基酶归为同一 P450 家族即 CYP51。

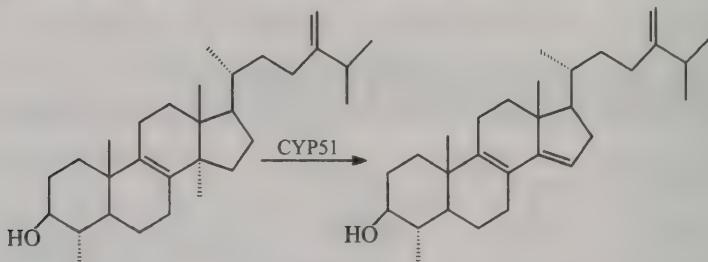


图 7.11 植物钝叶鼠曲草醇的脱甲基作用

#### 7.1.4 生物碱

许多研究报告阐明 P450 在生物碱合成中的作用。但在许多情况下, 生物碱合成中的生物碱及其催化剂含量很低而且分布于特定的细胞中。小檗宁合酶(berbamunine synthae, BS)催化两个分子 N-甲基乌药碱(methylcoclaurine)氧化形成二聚体的生物碱——小檗宁(图 7.12)。用从小檗(*Berberis stolonifera*)培养细胞中纯化的小檗宁合酶与还原酶重组体系, 表现出高度的位置和立体特异性。用等摩尔的底物 (R)-和 (S)-N-甲基乌药碱, 小檗宁合酶产生几乎全是 (R,S)-小檗宁, 但用不同配比的单体底物, 小檗宁合酶也可合成小檗宁的非对映体 guattegaumerine 或相关生物碱 2'-norberbamunine (Czernic et al., 1996)。这些数据表明, 体内不同二聚体生物碱的相对丰度可能依赖于可获得单体的摩尔比率。氧化程度更高的二聚体阿莫灵(aromoline)也发现在小檗培养细胞中, 但并非是小檗宁合酶催化的产物, 可能由另一 P450 的催化产生。根据纯化蛋白的序列数据已克隆编码小檗宁合酶的 cDNA, 该基因在杆状病毒系统中表达(Krau and Kutchan, 1995), 其转换率为 34~62/min(以产生的二聚体计算), 与从它的天然来源测得的 50/min 类似。但是即使有等摩尔的 (R)-和 (S)-N-甲基乌药碱存在, 杆状病毒系统中表达的酶催化产生的二聚体生物碱的种类有明显不同, 以 guattegaumerine 为主要产物。这种差别的原因现在还不太清楚, P450 还原酶来源的不同可能有较大的影响, 由此预示蛋白折叠的细微变化或蛋白-蛋白相互作用(电子传递)可能影响二聚体产物的比率。

用 BS 的 cDNA 为探针, 与小檗基因组 DNA Southern 分析表明, 基因组 DNA 有一条强的杂交带和二条较弱的杂交带, 这表明在小檗基因组中存在一些相亲的核酸序列, 这些序列有可能是编码进一步氧化小檗宁(berbamunine)成阿莫灵和黄皮树碱(obamegine)的 P450。

小檗宁合酶的催化反应引起了人们的注意, 因为它需要通过涉及双基团结合(biradical coupling)的机制将两个单体二聚体化。如果以上假设成立, 则需要小檗宁合酶的催化部位能容纳两个生物碱单体, 小檗宁合酶是否存在两个底物结合部位还需要进一步证实。

小檗宁合酶与典型的 P450 区别在于催化 (R)-和 (S)-N-甲基乌药碱各一分子, 通过

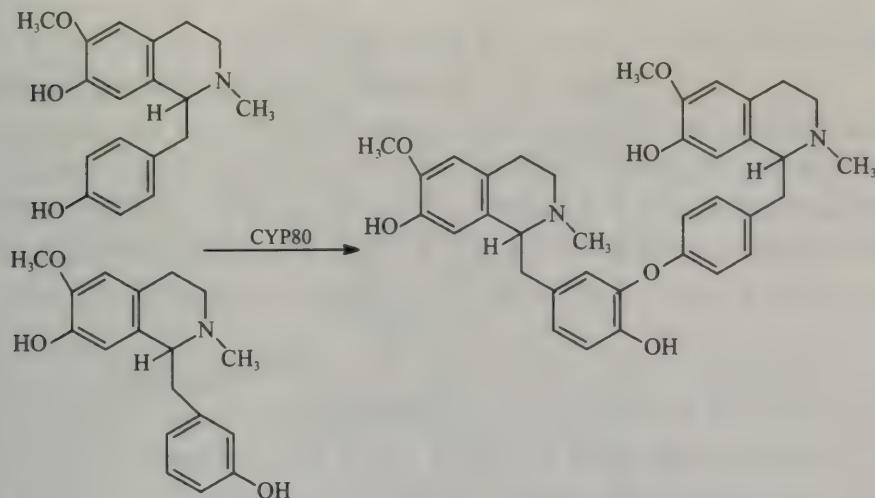


图 7.12 小檗碱的合成

分子间 C—O 键结合形成(R)-和(S)-二聚体生物碱小檗碱。这一反应依赖 NADPH-细胞色素 P450 还原酶,但小檗碱合酶起氧化酶作用,催化形成 C—O 键(Stadler and Zenk, 1993; Kutchan, 1995)。

苯基异喹啉生物碱的一个亚类是苯并菲啶生物碱,它们的生物合成也是由多功能 P450 催化的。其中高度氧化的生物碱 macarpine, 它在花菱草(*Eschscholtzia californica*)和罂粟(*Papaver somniferum*)的生物合成途径至少包括 6 个 P450 (Tanahashi and Zenk, 1990; De-Eknamkul *et al.*, 1992; Kammerer *et al.*, 1994), 这些 P450 严格依赖于 NADPH 和分子氧。

### 7.1.5 生氰糖苷的合成

两类植物天然产物(生氰糖苷和芥子油苷)来源于蛋白或非蛋白氨基酸,在其生物合成过程中,以醛肟(aldoximes)作为中间体。

生氰糖苷在 2000 多种植物中发现,当组织受伤时,生氰糖苷分解为糖、酮或醛以及氰化氢。蜀黍氰苷(dhurrin)是 *Sorghum bicolor* 中主要的生氰糖苷。它的生物合成由两个多功能系统完成,第一个系统是由酪氨酸经 N-羟基酪氨酸变成  $\rho$ -羟苯基乙醛肟( $\rho$ -hydroxyphenylacet aldoxime),第二个系统从对羟苯基乙醛肟通过对羟基苯乙腈( $\rho$ -hydroxyphenylacetonitrile)转化为对羟基苯乙醇腈( $\rho$ -hydroxymandelonitrile)(图 7.13)。

催化酪氨酸羟基化的 P450(酪氨酸-N-羟化酶,或 P450TYR)已被纯化(Sibbesen *et al.*, 1994),用其抗体筛选出了其对应的基因 CYP79A1(Koch *et al.*, 1995)。分析该基因推导的氨基酸序列发现,在氧结合囊保守区,存在一保守氨基酸替代:由苏氨酸替换为天冬氨酸,在邻近天冬氨酸还存在脯氨酸。这些结构特征可能与酶对底物的特异性有关。无独有偶,在真菌中发现的酪氨酸代谢酶(CYP56)也存在脯氨酸以及天冬氨酸替换特征(Koch *et al.*, 1995)。CYP79 的功能已从它在大肠杆菌的表达的活性中得到进一步证实,重组体系具有催化酪氨酸生成对羟基乙醛肟的活性(Sibbesen *et al.*, 1995)。

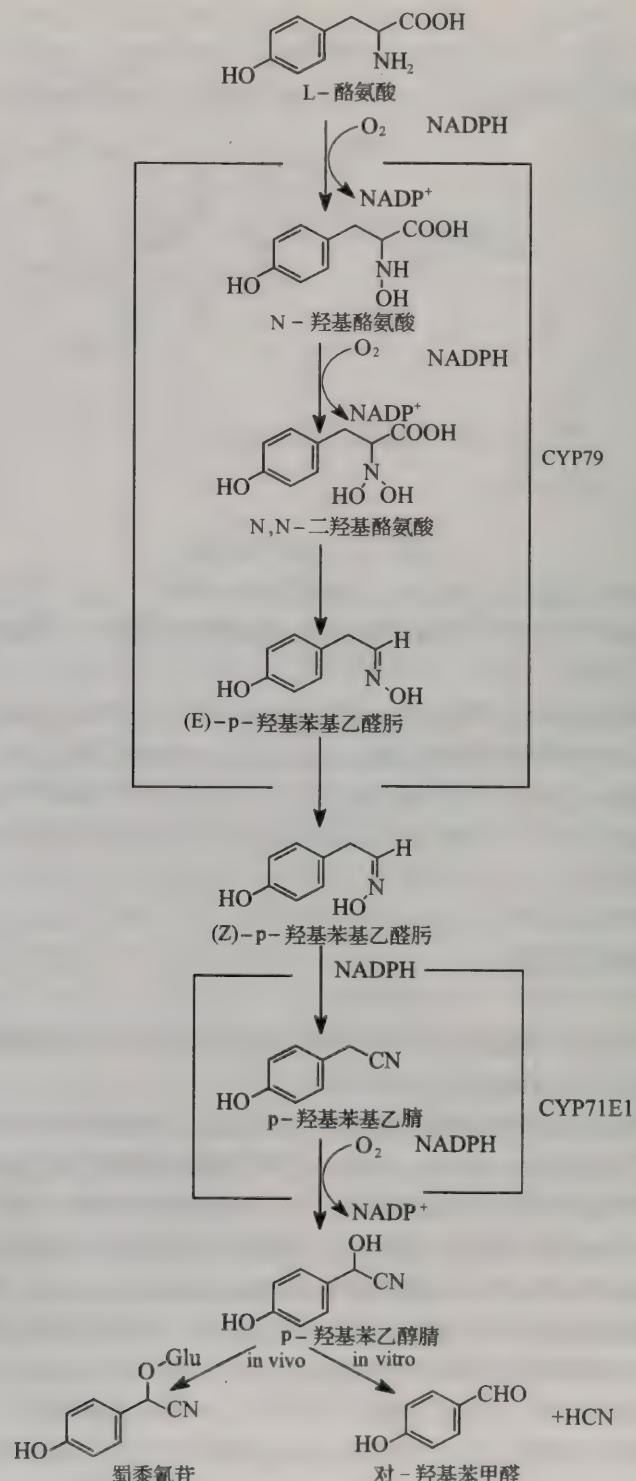


图 7.13 蜀黍氰苷的合成

参与蜀黍氯苷生物合成的另一个 P450 (P450ox) 的基因也从 *Sorghum bicolor* (L.) 中分离, 命名为 CYP71E1。用在大肠杆菌中异源表达得到的 CYP71E1 蛋白重组的酶系可以催化对羟苯基乙腈转化为对羟苯乙醇腈 (Bak *et al.*, 1998)。

*Sorghum bicolor* (L.) 中参与蜀黍氯苷生物合成的两个多功能细胞色素 P450 (CYP79A1 和 CYP71E1) 具有不同的性质和功能, 其中 CYP79A1 具有很高的底物专一性, 酪氨酸是已知的惟一底物, 而 CYP71E1 对底物要求较低, 可以有效地代谢芳族肟, 但对脂族肟代谢较慢。CYP79A1 和 CYP71E1 对许多不同除草剂都无代谢作用。因此报道的 *Sorghum* 对灭草松 (bentazon) 的抗性与 CYP79A1 和 CYP71E1 无关 (Kahn *et al.*, 1999)。

用 NADPH 作辅助因子, CYP79A1 和 CYP71E1 的  $K_m$  和  $V_{max}$  值分别为 0.013 mmol/L 和 111 nmol/(mg·pro·s), 如用 NADH 作辅助因子则对应的值分别为 0.3 mmol/L 和 42 nmol/(mg·pro·s), 可见 NADPH 更合适。CYP79A1 是稳定的酶, 而 CYP71E1 不稳定, 在室温下降解。CYP71E1 催化肟发生异常的脱水作用形成相应的腈, 再进行 C-羟基化。混合 CYP79 和 CYP71E1 的重组体系可将酪氨酸转化为对-羟基苯甲醛 (图 7.13), 表明离体的重组体系可以完成蜀黍氯苷生物合成途径中除糖基化外的所有反应 (Bak, 1998)。

### 7.1.6 P450 催化 DIMBOA 生物合成

植物中包含的防御次生性物质很多, 其中包括环化的异羟肟酸。禾本科累积的 1,4-苯并恶唑-3-酮 (1,4-benzoxazin-3-one) 衍生物包括 DIMBOA (2,4-二羟基-7-甲氧基-1,4-苯并恶唑-3-酮) 和 DIBOA (2,4-二羟基-1,4-苯并恶唑-3-酮), 它们在植物病原菌和昆虫抗性中起重要作用 (Niemeyer, 1988)。小麦和玉米中主要是 DIMBOA, 黑麦中主要是 DIBOA。DIMBOA 类物质的生物合成包含 P450 催化反应, 如将 HBOA (2-羟基-1,4-苯并恶唑-3-酮) N-羟基化为二羟基衍生物 DIBOA (Bailey and Larson, 1991)。

从玉米中鉴定出一个 DIMBOA 缺失突变体 (*bx1*), 这加速了 DIMBOA 生物合成有关 P450 基因的克隆 (Frey *et al.*, 1995)。最近, 4 个 CYP71 克隆 (CYP71C1~CYP71C4) 参与了 DIMBOA 生物合成已得到了明确地证明。首先用回交遗传方法 (reverse genetic) 鉴定了玉米突变体缺失 DIMBOA 合成的功能是由于 CYP71C2 基因中 *Mu* 转座子插入 (Frey *et al.*, 1997)。其次, 将 cDNA 在酵母中表达证明这些 P450 分别催化由吲哚至 DIBOA 间氧化过程中的某一步 (图 7.14)。CYP71C3 编码 N-羟化酶, 催化 HBOA 向 DIBOA 转化 (Bailey and Larson, 1991)。

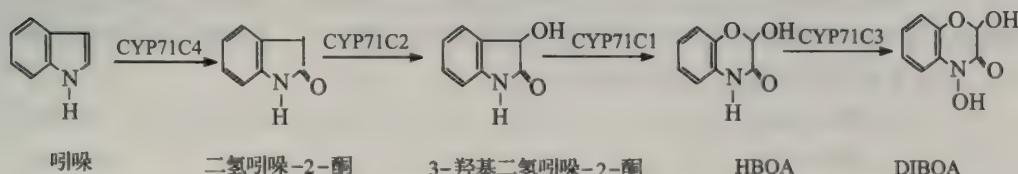


图 7.14 DIMBOA 生物合成

CYP71C 基因组克隆序列分析显示, 几个基因有共同的内含子定位。*Bx1* 基因座编码色氨酸合成酶及其同源物(homologue), 可转化吲哚 3-磷酸甘油(glycerol phosphate)为吲哚, 用于 DIMBOA 的生物合成(Frey *et al.*, 1997)。*Bx1* 基因与 CYP71C4 基因相距不到 2.5kb。可见玉米 DIBOA 生物合成途径的酶由 4 号染色体的相对较小区域的 DNA 编码, 且至少其中 4 个基因具有共同的进化祖先。

### 7.1.7 催化油菜素类固醇生物合成的 P450 (CYP90, CYP85)

油菜素类固醇(brassinosteroid)是植物激素, 从 *Arabidopsis* 中克隆了一个 P450 基因(CPD)编码非“A 组”的 P450, 定名为 CYP90。加入外源的 23-羟基化的油菜素内酯前体 teasterone(结构见图 7.15)可以互补 CPD 突变表现型, 而用其他前体无此效果, 为此认为 CYP90 催化 cathasterone 羟基化为 teasterone(图 7.15)。CYP90 基因组含 8 个内含子, 其中有二个内含子与人 CYP21A2 基因的内含子的位置相同, CYP21A2 基因编码孕酮(progesterone)-21-羟化酶(Higashi *et al.*, 1986; White *et al.*, 1986)也是甾醇代谢酶。这些结果显示, 参与植物和人甾醇羟基化作用的 P450 间可能有比大多数植物和动物 P450 间更近缘的进化祖先。

最近用突变体方法从番茄中克隆出另一个非“A 组”的 P450, 定名为 CYP85, 可能是催化油菜素类固醇生物合成的另一 P450(Bishop *et al.*, 1996)。

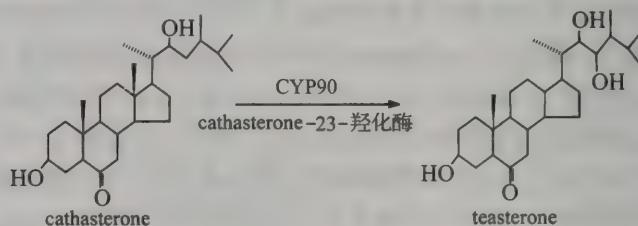


图 7.15 油菜素类固醇的生物合成

## 7.2 解毒酶

植物 P450 除了具有生物合成的活性外, 还具有分解天然产物的功能。在 *Salvia officinalis*, 单萜樟脑被氧化为 6-外-羟基樟脑, 这一过程是由微粒体 P450(樟脑 6-外-羟化酶)催化完成(Funk and Croteau, 1993)。而存在于假单孢菌的可溶性 P450(P450cam, CYP101)羟基化樟脑的位置在 5-外(5-外-羟化酶)(Sligar and Murray, 1986)。一些用作模式底物以测定哺乳动物 P450 活性的合成的荧光底物(如 7-乙氧香豆素和 7-乙氧试卤灵)也可被植物中的某些 P450 分解(Batard *et al.*, 1995)。

另一类主要的 P450 介导的反应是除草剂、农药和外源物质的解毒途径。植物对许多除草剂产生的生物化学抗性是因为除草剂被快速转化为羟基化的失活产物(Frear *et al.*, 1991), 这些产物随后与植物细胞壁的糖类分子结合。P450 对除草剂的代谢作用已知包括小麦和玉米对绿麦隆(chlortoluron)的 N-脱甲基作用和环甲基的羟基化作用

(Mougin *et al.*, 1990; Fonne-Pfister and Kreuz, 1990)、小麦中禾草灵(diclofop)的芳基羟化作用(McFadden *et al.*, 1989; Zimmerlin and Durst, 1990, Persans and Schuler, 1995)、小麦中醚苯磺隆(triasulfuron)和绿磺隆(chlorsulfuron)的芳基羟基化(Moreland *et al.*, 1993; Persans and Schuler, 1995; Thalacker *et al.*, 1994)、玉米中氟嘧黄隆(primsulfuron)的芳基和嘧啶环羟基化(Fonne-Pfister *et al.*, 1990)、玉米对灭草松(bentazon)的芳基羟基化作用等(McFadden *et al.*, 1990)。除此之外, P450 也介导一系列天然和合成杀虫剂及外源物质的代谢(Cole, 1983)(图 7.16)。

从植物代谢的除草剂范围看来, 一种植物中可能存在几种不同的 P450 催化除草剂的解毒。现在还不能明确具有这种解毒功能的 P450 是否与微生物合成作用的 P450 相同。近期的研究结果显示, 内源性的月桂酸和外源性的禾草灵可能被相同的 P450 羟基化(Zimmerlin and Durst, 1992)。用酵母表达的反式-肉桂酸羟化酶(CYP73A)的重组体系证明, 内源性反式-肉桂酸和外源性的绿麦隆和对-氯-N-甲基苯胺都可被 t-CAH 代谢, 但反应速率不同(Pierrel *et al.*, 1994), t-CAH 对其内源性底物代谢效率(297/min)比绿麦隆(0.014/min)有效得多。绿麦隆被 t-CAH 羟基化作用的部位对应于植物体内产生的最少量的绿麦隆代谢产物, 因此植物体内催化绿麦隆另一位置羟基化, 可能是一种不同于 t-CAH 的 P450。

表 7.4 植物 P450 催化的外源物质的代谢举例

杂原子脱烷基	双键氧化	羟基化	杂原子氧化
灭草隆(monuron)	2,4-D	绿麦隆	二噁磷
N-甲基-4-氯苯胺	灭草松	阔草清(flumetsulam)	
氨基比林	氟嘧黄隆		
绿麦隆	阔草清		
乙氧香豆素	禾草灵		
乙氧试卤灵	醚苯磺隆		
特丁异丙(metolachlor)			

从植物中已克隆和鉴定具有代谢除草剂的 P450, 如 CYP71A11, CYP73A1, CYP76B1, CYP81B1, CYP81B2 表现出对绿麦隆的代谢活性(表 7.5)。

表 7.5 具除草剂代谢作用的植物 P450

P450	底物	
	内源性	外源性
CYP71A10		多种除草剂
CYP71A11		绿麦隆
CYP73A1		绿麦隆
CYP76B1		多种外源物质
CYP81B1	脂肪酸	绿麦隆
CYP81B2		绿麦隆

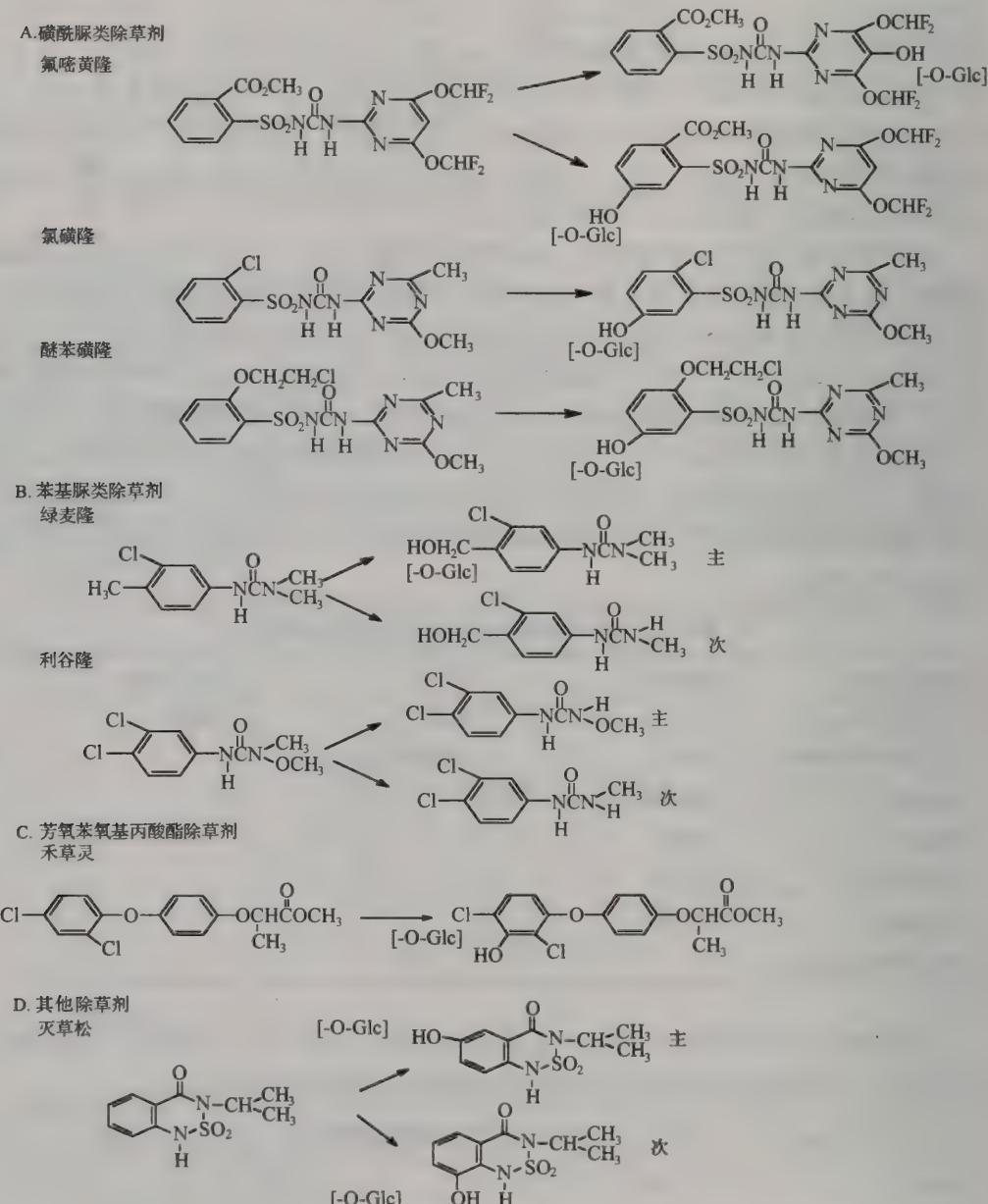


图 7.16 P450 对除草剂的代谢

Robineau 等(1998)根据 P450 可被外源物质诱导的特性从菊芋 (*Helianthus tuberosus*) 中分离的 CYP76B1 具有高效代谢除草剂以及结构多样的外源化合物的功能。通过在酵母中表达测定 CYP76B1 的代谢活性发现, CYP76B1 除具有 Batard 等(1998)报道的 7-乙氧香豆素脱烷基作用外, 对许多外源物质如苯并芘、药物 AP、荧光烷氧香豆素(7-甲氧香豆素, 7-丙氧香豆素), 烷氧试卤灵(7-甲氧试卤灵, 7-乙氧试卤灵, 7-戊氧试卤灵

和 7-苯氧试卤灵)以及各种不同类型除草剂[如 2,4-D, 禾草灵, 绿麦隆, 灭草松(bentazon), 麦草畏(dicamba), 异丙隆(isopropuron)]具有代谢活性, 但 CYP76B1 对内源性物质如酚类(肉桂酸、苯甲酸、阿魏酸)、类异戊二烯(香叶醇, 钝叶鼠曲草醇)或脂肪酸无活性。CYP76B1 对绿麦隆和异丙隆表现出单- 和双- N- 脱甲基作用。其他苯基脲类与 CYP76B1 的活性中心具有高结合亲和性, 预示 CYP76B1 可以对大多数苯基脲类发生脱烷基作用。CYP76B1 的 N- 脱甲基作用非常快, 它对绿麦隆和异丙隆的第一个脱甲基作用的转换率分别为 803/min 和 147/min, 可以与植物中生理性底物的转换率相比拟。甚至第二个脱甲基作用也具有相对高的转换率(46/min)。一些其他 P450 也报道具有代谢绿麦隆的活性, 如两个酵母表达的植物酶 CYP73A1(Pierrel *et al.*, 1994)和 CYP81B1(Cabellero-Hurtado *et al.*, 1998)也可催化绿麦隆环-甲基羟化作用, 但其反应速率相当慢。因此认为 CYP76B1 是高等植物主要代谢苯基脲的 P450, 可能在苯基脲类除草剂的解毒中发挥重要作用。鉴于苯基脲类除草剂已广泛使用, 成为主要的污染源, 因此, CYP76B1 可望用于污染源的生物除污。

从以上分析可见, 植物 P450 与其底物的关系如同哺乳动物 P450 与其底物关系一样复杂, 有些 P450 如 t-CAH 能够催化底物的范围较窄; 而其他植物 P450 如香叶醇/橙花醇羟化酶和环氧化酶, 可以不同方式作用于相同底物上; 有些 P450, 如类黄酮 3',5'-羟化酶可以催化多个不同底物; 有些 P450 如 P450<sub>TYR</sub> 和 P450<sub>OX</sub> 可以对一个底物进行多重的连续的反应。

植物 P450 具有重要的生物合成功能, 它参与许多植物物质的代谢途径。合成的物质有些是植物生长发育所必需, 有些是防御物质或信号分子。植物 P450 对除草剂的代谢在除草剂选择性和抗性中具有重要作用。

### 参 考 文 献

赵剑, 杨文杰, 朱蔚华. 1999. 细胞色素 P450 与植物的次生代谢. 生命科学, 11(3): 127~131

Akashi T, Aoki T, Ayabe S. 1998a. CYP81E1, a cytochrome P450 cDNA of Licorice (*Glycyrrhiza echinata* L.) encodes isoflavone 2'-hydroxylase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 251: 67~70

Akashi T, Aoki T, Ayabe S. 1998b. Identification of a cytochrome P450 cDNA encoding (2S)-flavanone 2-hydroxylase of licorice (*Glycyrrhiza echinata* L. : Fabaceae) which represents Licidione synthase and flavone synthase II. *FEBS Letters*, 431: 287~290

Bailey B A, Larson R L. 1991. Maize microsomal benzoxazinone N-monooxygenase. *Plant Physiol.*, 95: 792~796

Bak S, Kahn R A, Olsen C E *et al.* 1997. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the obtusifoliol 14 $\alpha$ -demethylase of *Sorghum bicolor* (L.) Moench, a cytochrome P450 orthologous to the sterol 14 $\alpha$ -demethylase (CYP51) from fungi and mammals. *Plant J.*, 11: 191~201

Bak S, Kahn R A, Nielsen H L *et al.* 1998. Cloning of three A-type cytochrome P450, CYP71E1, CYP98 and CYP99 from *Sorghum bicolor* (L.) Moench by a PCR approach and identification by expression in *Escherichia coli* of CYP71E1 as a multifunctional cytochrome P450 in the biosynthesis of the cyanogenic glucoside dhurrin. *Plant Molecular Biology*, 36: 393~405

Baltrusch M, Fulda M, Wolter F-P *et al.* 1997. Cloning and sequencing of a cytochrome P450 from *Pisum sativum* L. (Accession No. Z49263). *Plant Physiol.*, 114: 1568

Batard Y, LetRet M, Schalk M *et al.* 1998. Molecular cloning and functional expression in yeast of CYP76B1, a xenobiotic-inducible 7-ethoxycoumarin O-deethylase from *Helianthus tuberosus*. *Plant J.*, 14: 111~120

Batard Y, Schalk M, Pierrel M-A *et al.* 1997. Regulation of the cinnamate 4-hydroxylase (CYP73A1) in *Jerusalem*

*artichoke* tubers in response to wounding and chemical treatments. *Plant Physiol.*, 113:951~959

Batard Y, Zimmerlin A, LeRet M et al. 1995. Multiple xenobiotic-inducible P450 are involved in alkoxycoumarin and alkoxyresorufin metabolism in higher plants. *Plant Cell Environ.*, 18:523

Beale G H, Price J R, Scott-Moncreiff R. 1940. The genetics of *Verbena* II. Chemistry of the flower colour variations. *J. Genet.*, 41: 65~74

Bell-Lelong D A, Cusumano J C, Meyer K et al. 1997. Cinnamate-4-hydroxylase expression in *Arabidopsis*. Regulation in response to development and the environment. *Plant Physiol.*, 113:729~738

Benveniste I, Durst F. 1995. Cloning sequencing and expression of CYP86, a new cytochrome P450 from *Arabidopsis thaliana* (Accession No. X90458) (PGR95~074). *Plant Physiol.*, 109:722

Benveniste I, Salaun J P, Durst F. 1978. Cinnamic acid Phytochrome-mediated regulation of a monooxygenase hydroxylating cinnamic acid in etiolated pea seedling. *Phytochemistry*, 17:1511

Benveniste I, Salaun J P, Durst F. 1977. Wounding-induced cinnamic acid hydroxylase in Jerusalem artichoke tuber. *Phytochemistry* 16: 69~73

Bishop G J, Harrison K, Jones JDG. 1996. The tomato *dwarf* gene isolated by heterologous transposon tagging encodes the first member of a new cytochrome P450 family. *Plant Cell*, 8:959~969

Bolwell G P, Bozak K, Zimmerlin A. 1994. Plant Cytochrome P450. *Phytochemistry*, 37(6): 1491~1506

Bozak K R, O'Keefe D P, Christoffersen RE. 1992. Expression of a ripening-related avocado (*Persea americana*) cytochrome P450 in yeast. *Plant Physiol.*, 100: 1976~1981

Bozak K R, Yu H, Sirevag R et al. 1990. Sequence analysis of ripening-related cytochrome P450 cDNAs from avocado fruit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 3904~3908

Buell C R, Somerville S C. 1995. Expression of defense-related and putative signaling genes during tolerant and susceptible interactions of *Arabidopsis* with *Xanthomonas campestris* cv. *campestris*. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 8:435~443

Cabello-Hurtado F, Batard Y, Salaun J P et al. 1998. Cloning expression in yeast and functional characterization of CYP81B1, a plant P450 which catalyzes inchain hydroxylation of fatty acids. *J. Biol. Chem.*, 273: 7260~7267

Cabello-Hurtado F, Zimmerlin A, Rahier A et al. 1997. Cloning and functional expression in yeast of a cDNA coding for an obtusifolol 14 $\alpha$ -demethylase (CYP51) in wheat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 230: 381~385

Chapple CCS. 1995. A cDNA encoding a novel cytochrome P450 dependent monooxygenase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.*, 108: 875~876

Chapple CCS, Vogt T, Ellis B E et al. 1992. An *Arabidopsis* mutant defective in the general phenylpropanoid pathway. *Plant Cell*, 4: 1413~1424

Chiang H-H, Hwang I, Goodman H M. 1995. Isolation of the *Arabidopsis* GA4 locus. *Plant Cell*, 7:195~201

Clark I M, Forde B G, Hallahan D L. 1997. Spatially distinct expression of two new cytochrome P450s in leaves of *Nepeta racemosa*: identification of a trichome-specific isoform. *Plant Mol. Biol.*, 33: 875~885

Clemens S, Hinderer W, Wittkampf U et al. 1993. Characterization of cytochrome P450-dependent isoflavone hydroxylases from chickpea. *Phytochemistry*, 32:653

Cole D. 1983. Oxidation of xenobiotics in plants. In: *Progress in Pesticide Biochemistry and Toxicology*, Hutson DH and Roberts TR (eds.). John Wiley & Sons, 3

Cooker R, Raynal M, Laudie M, Grellet F, Delseny M et al. 1996. Further progress towards a catalogue of all *Arabidopsis* genes: analysis of a set of 5000 nonredundant ESTs. *Plant J.*, 9: 101~124

Courtney K J, Percival F W, Hallahan D L, Christoffersen R E. 1996. Cloning and sequencing of a cytochrome P450, CYP89, from *Arabidopsis thaliana* (Accession No. U6123) (PGR96-061). *Plant Physiol.* 112:445

Czernic P, Huang H C, Marco Y. 1996. Characterization of *hsr201* and *hsr515*, two tobacco genes preferentially expressed during the hypersensitive reaction provoked by phytopathogenic bacteria. *Plant Mol. Biol.*, 31: 255~265

Czernic P, Moliere F, Marco Y. 1996a. Structural organization of a genomic clone encoding a cytochrome P450-dependent monooxygenase from *Nicotiana tabacum* (Accession No. X96784) (PGR96-034). *Plant Physiol.*, 111:652

De-Eknamkul W, Tanahashi T, Zenk M H. 1992. Enzymic 10-hydroxylation and 10-O-methylation of dihydrosanguinarine

in dihydrochelirubine formation by *Eschscholtzia*. *Phytochemistry*, 31:2713

Dhavalikar R S, Bhattacharyya P K. 1966. Microbiological transformations of terpenes: Part VIII. Fermentation of limonene by a soil *Pseudomonad*. *Indian J. Biochem.*, 3:144

Doodeman M, Tabak AJH, Schram A W et al. 1982. Hydroxylation of cinnamic acids and flavonoids during biosynthesis of anthocyanins in *Petunia hybrida*. *Horticul. Planta*, 154: 546~549

Durst F, Benverriste I, Salaun J P et al. 1992. Function Mechanism And Regulation Of Cytochrome P450enzymes In Plant. *Biochem. Soc. Trans.*, 20: 353~357

Durst F, O'Keefe D P. 1995. Diversity and evolution of Plant P450s and P450-reductases. *Drug Metab. Drug interact.*, 12:189~206

Durst F, O'Keefe D P. 1995. Plant cytochromes P450: an overview. *Drug Metab. Drug. Interact.*, 12:171~187

Fahrendorf T, Dixon R A. 1993. Stress-responses in alfalfa (*Medicago sativa* L): Molecular cloning and expression of the elicitor-inducible cinnamic acid 4-hydroxylase cytochrome P450. *Arch. Biochem. Biophys.*, 305, 509~515

Finkelstein R R, Zeevaart JAD. 1994. Gibberellin and abscisic acid biosynthesis and respinse. In *Arabidopsis*, ed. EM Meyerowitz, C R Somerville, 523~553. NY: Cold Spring Harbor Press

Fonne-Pfister R, Kreuz K. 1990. Ring-methyl hydroxylation of chlortoluron by an inducible cytochrome P450-dependent enzyme from maize. *Phytochemistry*, 29: 2793

Fonne-Pfister R, Gaudin J, Kreuz K et al. 1990. Hydroxylation of primisulfuron by an inducible cytochrome P450-dependent monooxygenase system from maize. *Pesticide Biochem. Physiol.*, 37: 165

Forkmann G. 1991. Flavonoids as flower pigments: the formation of the natural spectrum and its extension by genetic engineering. *Plant Breeding*, 106:1

Forkmann G, Heller W, Grisebach H. 1980. Anthocyanin biosynthesis in flowers of *Matthiola incana*. Flavanone 3- and flavonoid 3'-hydroxylases. *Z. Naturforsch. Teil C*, 35:691~695

Forkmann G, Stotz G. 1981. Genetic control of flavanone 3-hydroxylase activity and flavonoid 3-hydroxylase activity in *Antirrhinum majus* (snapdragon). *Z. Naturforsch. Teil C*, 36:411~416

Frank M R, Deyneka J M, Schuler M A. 1996. Cloning of wound-induced cytochrome P450 monooxygenases expressed in pea. *Plant Physiol.*, 110:1035~1046

Frear D S, Swanson H R, Thalacker F W. 1991. Induced microsomal oxidation of diclofop, triasulfuron, chlorsulfuron and linuron in wheat. *Pesti. Biochem. Physiol.*, 41:274

Frey M, Chomet P, Glawisching E et al. 1997. Analysis of a chemical plant defense mechanism in grasses. *Science*, 277: 696~699

Frey M, Kliem R, Saedler H et al. 1995. Expression of a cytochrome P450 gene family in maize. *Mol. Gen. Genet.*, 246: 100~109

Funk C, Croteau R. 1993. Induction and characterization of a cytochrome P450-dependent camphor hydroxylase in tissue cultures of common sage (*Salvia officinalis*). *Plant Physiol.*, 101: 1231

Ge L, Chiang V L. 1996. A full length cDNA encoding trans-cinnamate 4-hydroxylase from developing xylem of *Populus tremuloides* (Accession No. U47293) (PGR96-075). *Plant Physiol.*, 112: 861

Graebe J E. 1987. Gibberellin biosynthesis and control. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 38: 419~465

Grand C. 1984. Ferulic acid 5-hydroxylase: A new cytochrome P450-dependent enzyme from higher plant microsomes involved in lignin synthesis. *FEBS Lett.*, 169: 7~11

Hagmann M-L, Heller W, Grisebach H. 1984. Induction of phytoalexin synthesis in soybean. Stereospecific 3,9-dihydroxyperocarpan 6 $\alpha$ -hydroxylase from elicitor-induced soybean cell cultures. *Eur. J. Biochem.*, 142:127

Hallahan D L, Lau S-MC, Harder P A et al. 1994. Cytochrome P450-catalysed monoterpenoid oxidation in catmint (*Nepe-ta racemosa*) and avocado (*Persea americana*): evidence for related enzymes with different activities. *Biochem. Biophys. Acta.*, 1201:94~100

Hamerski D, Matern U. 1988a. Elicitor-induced biosynthesis of psoralens in *Ammi majus* L. suspension cultures. *Eur. J. Biochem.*, 171:369

Hamerski D, Matern U. 1988b. Biosynthesis of psoralens. Psoralen 5-monoxygenase activity from elicitor-treated *Ammi majus* cells. *FEBS*, 239:263

Harms K, Alzorn R, Brash A et al. 1995. Expression of a flax allene oxide synthase cDNA leads to increased endogenous jasmonic acid (JA) levels in transgenic potato plants but not to a corresponding activation of JA-responding genes. *Plant Cell*, 7: 1645~1654

Hedden P, Kamiya Y. 1997. Gibberellin biosynthesis: genes and their regulation. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 48:431~460

Higashi Y, Yoshioka H, Yamane M et al. 1986. Complete nucleotide sequence of two steroid 21-hydroxylase genes tandemly arranged in human chromosome: A pseudogene and a genuine gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83: 2841~2845

Hinderer W, Flentje U, Barz W. 1987. Microsomal isoflavone 2'- and 3'-hydroxylases from chickpea (*Cicer arietinum* L.) cell suspensions induced for pterocarpan phytoalexin formation. *FEBS Lett.*, 214:101

Holton T A. 1995. Modification of flower color via manipulation of P450 gene expression in transgenic plants. *Metab. Drug Interact.*, 12: 359~368

Holton T A, Cornish E C. 1995. Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. *Plant Cell*, 7:1071

Holton T A, Brugliera F, Lester D R et al. 1993. Cloning and expression of cytochrome P450 genes controlling flower colour. *Nature*, 366:276~279

Hotze M, Schroeder G, Schroeder J. 1995. Cinnamate 4-hydroxylase from *Catharanthus roseus* and a strategy for the functional expression of plant cytochrome P450 proteins as translational fusions with P450 reductase in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.*, 374: 345~350

Humphreys J M, Hemm M R, Chapple C. 1999. New routes for lignin biosynthesis defined by biochemical characterization cytochrome P450-dependent monooxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96: 10045~10050

Hutvagner G, Barta E, Banfalvi Z. 1997. Isolation and sequence analysis of a cDNA and a related gene for cytochrome P450 proteins from *Solanum chacoense*. *Gene*, 188: 247~252

Imaishi H, Matsumoto Y, Ishitobi U et al. 1999. Encoding of a cytochrome P450-dependent lauric acid monooxygenase by CYP703A1 specifically expressed in the floral buds of Petunia hybrida. *Biosci Biotechnol. Biochem.*, 63(2): 2082~2090

Jennings J C, Coolbaugh R C, Nakata D A et al. 1993. Characterization and solubilization of kaurenoic acid hydroxylase from *Gibberella fujikuroi*. *Plant Physiol.*, 101: 925

Kahn R A, Bak S, Olsen C E et al. 1996. Isolation and reconstitution of the heme-thiolate protein obtusifoliol 14 $\alpha$ -demethylase from *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *J. Biol. Chem.*, 271:32944~32950

Kahn R A, Fahrendorf T, Halkier B A et al. 1999. Substrate specificity of the cytochrome P450 enzymes CYP79A1 and CYP71E1 involved in the biosynthesis of the cyanogenic glucoside dhurrin in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Arch. Biochem. Biophys.*, 363(1): 9~18

Kammerer L, De-Eknamkul W, Zenk M H. 1994. Enzymic 12-hydroxylation and 12-O-methylation of dihydrochelirubine in dihydromacarpine formation by *Thalictrum bulgaricum*. *Phytochemistry*, 36:1409

Karp F, Harris J L, Croteau R. 1987. Metabolism of monoterpenes: demonstration of the hydroxylation of (+)-sabinene to (+)-cis-sabinol by an enzyme preparation from sage (*Salvia officinalis*) leaves. *Arch. Biochem. Biophys.*, 256:179

Karp F, Mihaliak C A, Harris J L et al. 1990. Monoterpene biosynthesis: Specificity of the hydroxylations of (-)-limonene by enzymes preparations from peppermint (*Mentha piperita*), spearmint (*Mentha spicata*) and perilla (*Perilla frutescens*) leaves. *Arch. Biochem. Biophys.*, 276:219

Kawai S, Mori A, Shiokawa T et al. 1996. Isolation and analysis of cinnamic acid 4-hydroxylase homologous genes from a hybrid aspen, *Populus kitakaniensis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 60: 1586~1597

Kende H, Zeevaart JAD. 1997. The five "classical" plant hormones. *Plant Cell*, 9: 1197~1210

Koch B M, Sibbesen O, Halkier B A et al. 1995. The primary sequence of cytochrome P450<sub>TYR</sub>, the multifunctional N-hydroxylase catalyzing the conversion of L-tyrosine to p-hydroxyphenylacet aldehyde oxime in the biosynthesis of the cyanogenic glucoside dhurrin in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Arch. Biochem. Biophys.*, 323: 177~186

Kochs G, Grisebach H. 1986. Enzymatic synthesis of isoflavones. *Eur. J. Biochem.*, 155:311

Kraus PFX, Kutchan T M. 1995. Molecular cloning and heterologous expression of a cDNA encoding berbamine synthase, a C-O phenol-coupling cytochrome P450 from the higher plant *Berberis stolonifera*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 2071~2075

Kutchan T M. 1995. Alkaloid biosynthesis the basis for metabolic engineering of medicinal plants. *Plant Cell*, 7: 1059

Larkin J C. 1994. Isolation of a cytochrome P450 homologue preferentially expressed in developing inflorescences of *Zea mays*. *Plant Mol. Biol.*, 25: 343~353

Lau S-M C, Harder P A, O'Keefe D P. 1993. Low carbon monoxide affinity allene oxide synthase is the predominant cytochrome P450 in many plant tissues. *Biochemistry*, 32: 1945~1950

Laudert D, Pfannschmidt U, Lottspeich F et al. 1996. Cloning molecular and functional characterization of *Arabidopsis thaliana* allene oxide synthase (CYP74), the first enzyme of the octadecanoid pathway to jasmonates. *Plant Mol. Biol.*, 31: 323~335

Leon J, Yalpani N, Raskin I et al. 1993. Induction of benzoic acid 2-hydroxylase in virus-inoculated tobacco. *Plant Physiol.*, 103: 323~328

Logemann E, Parniske M, Hahlbrock K. 1995. Modes of expression and common structural features of the complete phenylalanine ammonia-lyase family in parsley. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 5905~5909

Madyastha K M, Meehan T D, Coscia C J. 1976. Characterization of a cytochrome P450-dependent monoterpene hydroxylase from the higher plant *Vinca rosea*. *Biochemistry*, 15: 1097

Mangold U, Eichel J, Batschauer A et al. 1994. Gene and cDNA for plant cytochrome P450 proteins (CYP72 family) from *Catharanthus roseus* and transgenic expression of the gene and a cDNA in tobacco and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci.*, 96: 129~136

Martens S, Forkmann G. 1999. Cloning and expression of flavone synthase II from *Gerbera hybrids*. *Plant J.*, 20(5): 611~618

Matern U, Strasser H, Wendorff H et al. 1988. Coumarins and furanocoumarins, in *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*. Vol 5, Phytochemicals in Plant Cell Cultures, Constabel, F. and Vasil, IK, eds., Academic Press, San Diego, CA, 3

Matsui K, Shibusaki M, Hase T et al. 1996. Bell pepper fruit fatty acid hydroperoxide lyase is a cytochrome P450 (CYP74B). *FEBS Lett.*, 394: 21~24

Maughan J A, Nugent JHA, Hallahan D L. 1997. Expression of CYP71B7, a cytochrome P450 expressed sequence tag from *Arabidopsis thaliana*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 341: 104~111

McFadden J J, Frear D S, Mansager E R. 1989. Aryl hydroxylation of diclofop by a cytochrome P450 ~ dependent monooxygenase from wheat. *Pesticide Biochem. Physiol.*, 34: 92

McFadden J J, Gronwald J W, Eberlein C V. 1990. In vitro hydroxylation of bentazon microsomes from naphthalic anhydride-treated corn shoots. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 168: 206

McGarvey D J, Croteau R. 1995. Terpenoid metabolism. *Plant Cell*, 7: 1015

Meijer A H, Souer E, Verpoorte R et al. 1993. Isolation of cytochrome P450 cDNA clones from the higher plant *Catharanthus roseus* by a PCR strategy. *Plant Mol. Biol.*, 22: 379~383

Meijer A H, Verpoorte R, Hoge JHC. 1993a. Regulation of enzymes and genes involved in terpenoid indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*. *J. Plant. Res.*, 3: 145

Menting JGT, Scopes R K, Stevenson T W. 1994. Characterization of flavonoid 3', 5'-hydroxylase in microsomal membrane fraction of *Petunia hybrida* flowers. *Plant Physiol.*, 106: 533~542

Meyer K, Cusumano J C, Somerville C et al. 1996. Ferulate-5-hydroxylase from *Arabidopsis thaliana* defines a new family of cytochrome P450-dependent monooxygenases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 6869~6874

Mihaliak C A, Karp F, Croteau R. 1993. Cytochrome P450 terpene hydroxylases. In: *Methods in Plant Biochemistry*, Vol. 9. New York: Academic Press, 261

Mizutani M, Ohta D, Sato R. 1993. Purification and characterization of a cytochrome P450 (*trans*-cinnamic acid 4-hydroxylase) from etiolated mung bean seedlings. *Plant Cell Physiol.*, 34: 481~488

Mizutani M, Ohta D, Sato R. 1997. Isolation of a cDNA and a genomic clone encoding 4-hydroxylase from *Arabidopsis* and its expression manner in planta. *Plant Physiol.*, 113: 755~763

Mizutani M, Ward E, Dimaio J *et al.* 1993a. Molecular cloning and sequence of a cDNA encoding mung bean cytochrome P450 (P450<sub>CAH</sub>) possessing cinnamate 4-hydroxylase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 190: 875~880

Mizutani M, Ward E, Ohta D. 1998. Cytochrome P450 superfamily in *Arabidopsis thaliana*: Isolation of cDNAs, differential expression and RFLP mapping of multiple cytochrome P450. *Plant Molecular Biology*, 37: 39~52

Moreland D E, Corbin F T, McFarland J E. 1993. Oxidation of multiple substrates by corn shoot microsomes. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 47:206

Mougin C, Cabanne F, Canivenc M-C *et al.* 1990. Hydroxylation and N-demethylation of chlortoluron by wheat microsomal enzymes. *Plant Sci.*, 66:195

Murray RDH, Mendez J, Brown S A. 1982. *The Natural Coumarins*. J. Wiley & Sons, Chichester

Nadeau J A, Zhang X S, Li J *et al.* 1996. Ovule development: Identification of stage-specific and tissue-specific cDNAs. *Plant Cell*, 8:213~239

Newman T, de Brujin F J, Green P *et al.* 1994. Genes galore: A summary of methods for accessing results from large-scale partial sequencing of anonymous *Arabidopsis* cDNA clones. *Plant Physiol.*, 106:1241~1255

Niemeyer H M. 1988. Hydroxamic acids (4-hydroxy-1,4-benzoxazin-3-ones), defence chemicals in the Gramineae. *Phytochemistry*, 27:3349~3358

O'Keefe D P, Leto K J. 1989. Cytochrome P450 from the mesocarp of avocado (*Persea americana*). *Plant Physiol.*, 89: 1141~1149

Pan Z, Durst F, Werck-Reichhart D *et al.* 1995. The major protein of guayule rubber particles is a cytochrome P450. Characterization based on cDNA cloning and spectroscopic analysis of the solubilized enzyme and its reaction products. *J. Biol. Chem.*, 270:8487~8494

Persans M W, Schuler M A. 1995. Differential induction of cytochrome P450-mediated triasulfuron metabolism by naphthalic anhydride and triasulfuron. *Plant Physiol.*, 109:1483

Pierrel M A, Batard Y, Kazmaier M *et al.* 1994. Catalytic properties of the plant cytochrome P450 CYP73 expressed in yeast: substrate specificity of a cinnamate hydroxylase. *Eur. J. Biochem.*, 224: 835~844

Pinot F, Bosch H, Alayrac C *et al.* 1993. Hydroxylation of oleic acid in *Vicia sativa* microsomes. *Plant Physiol.*, 102: 1313

Rama Devi J, Bhattachatyya P. 1977a. Microbiological transformations of terpenes. Part XXIII. Fermentation of geraniol, nerol and limonene by a soil *Pseudomonas incognita* (lonalool strain). *Indian J. Biochem.*, 14:288

Rama Devi J, Bhattachatyya P. 1977b. Microbiological transformations of terpenes. Part XXIV. Pathways of degradation of linalool, geraniol, nerol and limonene by a soil *Pseudomonas incognita* (lonalool strain). *Indian J. Biochem. Biophys.*, 14: 359

Reichhart D, Salaun J P, Benveniste I *et al.* 1979. Induction by manganese, ethanol, phenobarbital and herbicides of microsomal cytochrome P450 in higher plant tissue. *Arch. Biochem. Biophys.*, 196:301~303

Robineau T, Batard Y, Nedelkina S *et al.* 1998. The chemically inducible plant cytochrome P450 CYP76B1. Actively metabolizes phenylureas and other xenobiotics. *Plant Physiol.*, 118: 1049~1056

Russell D W. 1971. The metabolism of aromatic compounds in higher plants. X. Properties of the cinnamic acid 4-hydroxylase of pea seedlings and some aspects of its metabolic and developmental control. *J. Biol. Chem.*, 246: 3870~3878

Russell D W, Conn E E. 1967. The cinnamic acid 4-hydroxylase of pea seedlings. *Arch. Biochem. Biophys.*, 122: 256~258

Salaun J-P, Helvig C. 1995. Cytochrome P450-dependent oxidation of fatty acids. *Drug Metabolism and Drug Interactions*, 12:261~283

Salaun J-P, Benveniste I, Reichhart D *et al.* 1978. A microsomal (cytochrome P450)-linked lauric acid monooxygenase from aged Jerusalem artichoke tuber tissue. *Eur. J. Biochem.*, 90:155

Schuler M A. 1996a. Plant Cytochrome P450 Monooxygenases. Critical Reviews. In: *Plant Sciences*, 15(3):235~284

Schuler M A. 1996. The role of cytochrome P450 monooxygenases in plant-insect interactions. *Plant Physiol.*, 112: 1411

~1419

Shen B, Carmeiro N, Torres-Jerez I et al. 1994. Partial sequencing and mapping of clones from two maize cDNA libraries. *Plant Mol. Biol.*, 26: 1085~1101

Shibata Y, Matsui K, Kajiwara T et al. 1995a. Purification and properties of fatty acid hydroperoxide lyase from green bell pepper fruits. *Plant Cell Physiol.*, 36:147~156

Shibata Y, Matsui K, Kajiwara T, Hatanaka A. 1995. Fatty acid hydroperoxide lyase is a heme protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 207:438~443

Shirley B W, Kubasek W L, Storz G et al. 1995. Analysis of *Arabidopsis* mutants deficient in flavonoid biosynthesis. *Plant.*, 8:659~671

Sibbesen O, Koch B, Halkier BA et al. 1995. Cytochrome P450<sub>TYR</sub> is a multifunctional heme-thiolate enzyme catalyzing the conversion of L-tyrosine to P-hydroxyphenylacet aldehyde oxime in the biosynthesis of the cyanogenic glucoside dhurrin in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *J. Biol. Chem.*, 270:3506~3511

Sibbesen O, Koch B, halkier BA et al. 1994. Isolation of the heme-thiolate enzyme cytochrome P450<sub>TYR</sub>, which catalyzes the committed step in the biosynthesis of the cyanogenic glucoside dhurrin in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:9740~9744

Siminnszky B, Corbin F T, Ward ER et al. 1999. Expression of a soybean cytochrome P450 monooxygenase cDNA in yeast and tobacco enhance the metabolism of phenylurea herbicides. *Proc. Acad. Sci. USA*, 96: 1750~1755

Sligar S G, Murray R I. 1986. Cytochrome P450cam and other bacterial P450 enzymes, in *Cytochrome P450: Structure, Mechanism and Biochemistry*, Ortiz de Montellano PR, ed., New York:Plenum Press, 429

Song W-C, Brash A R. 1991. Purification of an allene oxide synthase and identification of the enzyme as a cytochrome P450. *Science*, 253: 781

Song W-C, Baertschi S W, Boeglin W E et al. 1993a. Formation of epoxyalcohols by a purified allene oxide synthase. *J. Biol. Chem.*, 268: 6293

Song W-C, Brash A R. 1991. Purification of allene oxide synthase and identification of the enzyme as a cytochrome P450. *Science*, 253:781~784

Song W-C, Funk C D, Brash A R. 1993b. Molecular cloning of an allene oxide synthase: A cytochrome P450 specialized for the metabolism of fatty acid hydroperoxides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 8519~8523

Stadler R, Zenk M H. 1993. The Purification and characterization of a unique cytochrome P450 enzyme from *Berberis stolonifera* plant cell cultures. *J. Biol. Chem.*, 268: 823~831

Stewart C B, Schuler M A. 1989. Anigenic crossreactivity between bacterial and plant cytochrome P450 monooxygenases. *Plant Physiol.*, 90:534

Stotz G, de Vlaming P, Wiering H et al. 1985. Genetic and biochemical studies on flavonoid 3'-hydroxylation in flowers of *Petunia hybrida*. *Theor. Appl. Genet.*, 70:300

Stotz G, Forkmann G. 1981. Hydroxylation of the B-ring of flavonoids in the 3'- and 5'-position with enzyme extracts form flowers of *Verbena hybrida*. *Z. Naturforsch. Teil C*, 37:19~23

Sun T-P, Goodman H M, Ausubel F M. 1992. Cloning the *Arabidopsis* GA1 locus by genomic subtraction. *Plant Cell*, 4: 119~128

Suzuki G, Ohta H, Kato T et al. 1996. Induction of a novel cytochrome P450 (CYP93 family) by methyl jasmonate in soybean suspension-cultured cells. *FEBS Lett.*, 383:83~86

Suzuki G, Ohta H, Kato T et al. 1997. Molecular cloning of a cDNA encoding cytochrome P450 CYP93A2 (Accession No. D86531) from soybean suspension-cultured cells (PGR97~087). *Plant Physiol.*, 105: 755~756

Szekeres M, Nemeth K, Koncz-Kalman Z, Mathur J et al. 1996. Brassinosteroids rescue the deficiency of CYP90, a cytochrome P450, controlling cell elongation and de-etiolation in *Arabidopsis*. *Cell*, 85:171~182

Tabak AJH, Meyer H, Beenink GJH. 1978. Modification of the B-ring during flavonoid synthesis in *Petunia hybrida* : introduction of the 3'-hydroxyl group regulated by the gene Htl. *Planta*, 139: 67~71

Tanahashi T, Zenk M H. 1990. Elicitor induction and characterization of microsomal protopine-6-hydroxylase, the central

enzyme in benzophenanthridine alkaloid biosynthesis. *Phytochemistry*, 29:1113

Tanaka Y, Yonekura K, Fukuchi-Mizutani M et al. 1996. Molecular and biochemical characterization of three anthocyanin synthetic enzymes from *Gentiana triflora*. *Plant Cell. Physiol.*, 37:711~716

Taton M, Rahier A. 1991. Properties and structural requirements for substrate specificity of cytochrome P450-dependent obtusifoliol 14 $\alpha$ -demethylase from maize (*Zea mays*) seedlings. *Biochem. J.*, 277:483~492

Teutsch G H, Hasenfratz M P, Lesot A et al. 1993. Isolation and sequence of a cDNA encoding the Jerusalem artichoke cinnamale hydroxylase, a major plant cytochrome P450 involved in the general phenylpropanoid pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 4102~4106

Thalacker F W, Swanson H R, Frear D S. 1994. Characterization, purification and reconstitution of an inducible cytochrome P450-dependent triasulfuron hydroxylase from wheat. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 49: 209

Toguri T, Kobayashi O, Umemoto N. 1993. The cloning of eggplant seedling cDNAs encoding proteins from a novel cytochrome P450 family (CYP76). *Biochem. Biophys. Acta.*, 1216: 165~169

Toguri T, Tokugawa K. 1994. Cloning of eggplant hypocotyl cDNAs encoding cytochrome P450 belonging to a novel family (CYP77). *FEBS Lett.*, 338: 290~294

Toguri T, Umemoto N, Kobayashi O, Ohtani T. 1993a. Activation of anthocyanin synthesis genes by white light in eggplant hypocotyl tissues and identification of an inducible P450 cDNA. *Plant Mol. Biol.*, 23:933~946

Udvardi M K, Metzger J D, Krishmaillai V et al. 1994. Cloning and sequencing of a full-length cDNA from *Thlaspi arvense* L. that encodes a cytochrome P450. *Plant physiol.*, 105:755~756

Umemoto N, Kobayashi O, Ishizaki-Nishizawa O et al. 1993, cDNAs sequences encoding cytochrome P450 (CYP71 family) from eggplant seedlings. *FEBS Lett.*, 330:169~173

Urban P, Werck-Reichhart D, Teutsch H et al. 1994. Characterization of recombinant cinnamate 4-hydroxylase produced in yeast. Kinetic and spectral properties of the major plant P450 of the phenylpropanoid pathway. *Eur. J. Biochem.*, 222:843~850

Vetter H P, Mangold U, Schroder G et al. 1992. Molecular analysis and heterologous expression of an inducible cytochrome P450 protein from periwinkle (*Catharanthus roseus* L.). *Plant Physiol.*, 100:998~1007

Vick B A, Zimmerman D C. 1987. Pathways of fatty acid hydroperoxide metabolism in spinach leaf chloroplasts. *Plant Physiol.*, 85:1073~1078

Von Wachenfeldt C, Johnson E F. 1995. Structures of eukaryotic cytochrome P450 enzymes. In Ortiz Montellano PR, ed. 1995. *Cytochrome P450 Structure, Mechanism and Biochemistry*. Vol. 2, New York: Plenum, 183~223

Weissbart D, Salaun J-P, Durst F et al. 1992. Regio-selectivity of a plant lauric acid omega hydroxylase. Omega hydroxylation of *cis* and *trans* unsaturated lauric acid analogs and epoxidation of the terminal olefin by plant cytochrome P450. *Biochem. Biophys. Acta.*, 1124:135

Welle R, Grisebach H. 1988. Induction of phytoalexin synthesis in soybean: Enzymatic cyclization of prenylated pterocarps to glycoellin isomers. *Arch. Biochem. Biophys.*, 263:191

Wendroff H, Matern U. 1986. Differential response of cultured parsley cells to elicitors from two non-pathogenic strains of fungi. *Eur. J. Biochem.*, 161:391

Werck-Reichhart D, Batard Y, Kochs G et al. 1993. Monospecific polyclonal antibodies directed against purified cinnamate 4-hydroxylase *Helianthus tuberosus*: immunopurification, immunoquantitation and interspecies crossreactivity. *Plant Physiol.*, 102:1291~1298

Werck-Reichhart D. 1995. Cytochrome P450 in the phenylpropanoid metabolism. *Drug Metab. Drug Interact.* 12: 221~243

Werck-Reichhart D, Benveniste I, Teutsch H et al. 1991. Glycerol allows low-temperature phase separation of membrane proteins solubilized in Triton X-114: Application to the purification of plant cytochromes P450 and b<sub>5</sub>. *Anal. Biochem.*, 197:125~131

White P C, New M I, Dupont B. 1986. Structure of human steroid 21-hydroxylase genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83:5111~5115

Winkler R G, Hekentjaris T. 1995. The maize dwarf gene encodes a cytochrome P450-mediated early step in gibberellin biosynthesis. *Plant Cell*, 7: 1307~1317

Ye A-H, 1996. Expression of the cinnamic acid 4-hydroxylase gene during lignification in *Zinnia elegans*. *Plant Sci.*, 121: 133~141

Zimmerlin A Durst F. 1990. Xenobiotic metabolism in plants: Aryl hydroxylation of diclofop by a cytochrome P450 enzyme from wheat. *Phytochemistry*, 29: 1729

Zimmerlin A, Durst F. 1992. Aryl hydroxylation of the herbicide diclofop by a wheat cytochrome P450 monooxygenase. *Plant Physiol.*, 100: 874

Zimmerlin A, Salaun J P, Durst F *et al.* 1992. Cytochrome P450-dependent hydroxylation of lauric acid at the subterminal position and oxidation of unsaturated analogs in wheat microsomes, *Plant Physiol.*, 100: 868

## 第八章 昆虫细胞色素 P450 及其功能

P450 酶系在昆虫中的作用涉及生长、发育、取食等过程,它对外来物质的代谢是昆虫对杀虫剂抗药性及对植物有毒物质耐受性的原因,它还参与昆虫体内激素的合成和代谢(Feyereisen, 1999)。许多经济重要性害虫防治工作的失败及人们对 P450 酶系在其中作用的认识,促进了对昆虫 P450 的研究。但因昆虫 P450 本身的特点,用生物化学方法来研究昆虫 P450 的结构和功能受到了限制(Nelson *et al.*, 1993; Estabrook, 1996)。20世纪 80 年代兴起的分子生物学方法,使人们可以绕过这种困难,从分子水平上来研究昆虫的 P450。90 年代昆虫细胞色素 P450 的研究热点是对细胞色素 P450 基因多样性的描述及 P450 有关的抗性分子机制的探讨(邱星辉和冷欣夫, 1999)。

### 8.1 昆虫细胞色素 P450 基因

#### 8.1.1 昆虫 P450 的多样性

昆虫的第一个 P450cDNA 是由 Snyder 和 Davidson 分离的,但当时并不知道它是细胞色素 P450 基因,后来被重新发现而被定名为 CYP4E1 (Dunkov *et al.*, 1996)。至今已鉴定的昆虫 P450 基因分属 8 个基因家族 (CYP4, CYP6, CYP9, CYP12, CYP15, CYP18, CYP28, CYP48),新的基因还在不断报道。

P450 基因的多样性不仅表现在 P450 基因总数上,同种生物也存在多种 P450 基因,如已知按蚊至少有 17 种(Scott, 1996)、果蝇有 14 种(Frolov and Alatortsev, 1994)、家蝇有 13 种 P450 基因(含等位基因)(Scott, 1996)。昆虫的 P450 基因总数尚不清楚,预测果蝇基因组中含 60~100 个 P450 基因(Feyereisen, 1999)。

表 8.1 昆虫中的细胞色素 P450 基因举例

种类	已知基因
黄猩猩果蝇 <i>Drosophila melanogaster</i>	4d1, 4d2, 4d8, 4e1, 4e2, 4e3, 4e4, 4c3, 4g1, 4p1, 6A2, 9b1, 9b2, 9c3
家蝇 <i>Musca domestica</i>	6A1, 6A3, 6A4, 6A5, 6A6, 6C1, 6C2, 6D1
按蚊 <i>Anopheles albimanus</i>	4C2, 4C5, 4C6, 4C7, 4H1, 4H2, 4H3, 4H4, 4H5, 4H6, 4H7, 4H8, 4H9, 4J1, 4J2, 4J3, 4K1
蜚蠊 <i>Blaberus discoidalis</i>	4C1
烟蚜夜蛾 <i>Heliothis virescens</i>	9A1
棉铃虫 <i>Helicoverpa armeggeria</i>	6B2, 6B6, 6B7, 6B8
香芹黑凤蝶 <i>Papilio polyxene</i>	6B1, 6B3
烟草天蛾 <i> Manduca sexta</i>	4L1, 4L2, 4M1, 4M2, 4M3

### 8.1.2 昆虫 P450 基因的内含子——外显子结构

从已知昆虫的基因组克隆的核酸系列分析表明,大多数 P450 基因是断裂基因(split gene)。多数昆虫 P450 基因含一内含子。家蝇 CYP6 家族成员除 CYP6D1 外基因 CYP6A3, 6A4, 6A5, 6C1, 6C2 都像 P450CYP6A1 一样,含有一长度为 57~125bp 的短内含子,且它们的插入位置相同,断裂编码一保守位点 Glu(361)氨基酸的密码子(Cohen and Feyereisen, 1995)。而与 CYP6 进化关系较近的 P450 CYP3 家族却有 12 内含子,并且无与 CYP6A1 有相同的插入位点的内含子(Cohen and Reyereisen, 1995)。香芹黑凤蝶的 CYP6B1V3 基因含有一更长(471bp)的内含子,其插入部位 Gly(445)靠近 P450 血红素结合区与血红素结合的半胱氨酸残基(Prapaipong *et al.*, 1994),从香芹黑凤蝶分离的同族的 CYP6B3 基因有与 CYP6B1V3 相同位置的内含子(Hung *et al.*, 1995)。从家蝇中分离的另一 CYP6D1 基因有 3 个内含子,长度分别为 74, 66 和 64bp, 内含子和外显子接合(junction)遵循 GT-AG 规则。有趣的是 CYP6D1 的第 2, 3 内含子所在位置恰好分别是 CYP6A1 和 CYP6B1V3 的内含子所在位置(Tomita *et al.*, 1995)。

从按蚊 *A. albimanus* 中分离的 5 个 P450 基因组基因片段(CYP4D6, 4D7, 4H6, 4H8, 4J1)有一长度为 60~79bp 的内含子,它们在相同的位点上插入,与之同源的内含子在果蝇 4D2 和 4E1 中也存在(Scott *et al.*, 1994)。从果蝇中分离的 CYP4D2 基因(Frolov and Alatortsev, 1994)包含 4 个内含子,内含子和外显子接合都遵循 GT-AT 规则。该基因的内含子不断裂,编码血红素结合区的密码子。而同属 CYP4 家族的大鼠 CYP4A1 和 CYP4A2 分别有 12 和 11 内含子,其中有一内含子插入血红素结合区(Frolov and Alatortsev, 1994)。

内含子的存在被认为与进化有关。有人认为,基因通过内含子的消除而进化(Gilbert, 1987)。如果这样,则 CYP6A1 和 CYP6B1 应从 CYP6D1 进化而来(Tomita *et al.*, 1995)。但仅凭有限的有关内含子的信息,难于对进化与内含子的关系做出一般性的结论。

### 8.1.3 昆虫的 P450 基因簇(gene cluster)

P450 基因的多样性已被证明,但基因簇仅有少数几个例子(Cohen and Feyereisen, 1995)。在家蝇中发现的 P450 基因簇有 6 个属于 CYP6 家族的基因,它们紧密联接在 24kb 的 DNA 片段上。经 RFLP 分析证明该簇位于家蝇 5 号染色体。簇上 6 个基因有 5 个具有转录活性。基因 CYP6C1, CYP6C2, CYP6A3 与 CYP6A4, CYP6A5, CYP6A6 具有相对的取向(Sundseth *et al.*, 1990)。家蝇 CYP6 基因簇的基因氨基酸序列歧异较大,只有 39%~71% 的氨基酸同源,说明这簇基因在进化上是古老的(Sundseth *et al.*, 1990)。因此,Cohen and Feyereisen(1995)预测在其他双翅目或其他全变态昆虫中存在类似的基因簇。果蝇基因簇的发现初步验证了这一预言。

果蝇中已知有两个基因簇,其中一个位于 X 染色体,另一位于 2 号染色体。位于 X 染色体顶端的是一紧密相联的基因簇,大约在 20kbDNA 上有 4 个 P450 基因(CYP4D1,

*CYP4D2, CYP4D8, CYP4E4*), 基因间的歧异程度较大。位于 2 号染色体的 42D~45C 区间的基因簇联接较宽, 可以认为是簇系列, 其上有属于 3 个基因家族 (*CYP4, CYP6, CYP9*) 的 6 个 P450 基因 (Dunkov *et al.*, 1996)。

P450 基因簇可能是通过基因重复 (duplication) 和随后的歧异以获得新功能的正向选择的遗迹 (Cohen and Feyereisen, 1995)。家蝇 *CYP6* 基因簇的不同取向可能是基因重复和染色体倒位的结果 (Cohen and Feyereisen, 1995)。

#### 8.1.4 细胞色素 P450 的遗传多态性 (genetic polymorphism)

昆虫 P450 基因座的多态特征在昆虫中普遍存在。在香芹黑凤蝶中分离出三种等位基因, 基因组 *CYP6B1V3* 基因的核苷酸与 *CYP6B1V1*、*CYP6B1V2* cDNA 分别有 99.53%、99.59% 的相同。*CYP6B1V1* 与 *CYP6B1V2* 编码的蛋白质序列间只有 9 个氨基酸差异。*CYP6B1V3* 的变异在位置和排列上与其他两个 cDNA 相同: 6 个氨基酸变异位置与 *CYP6B1V1* 相同、三个与 *CYP6B1V2* 相同, 表明 *CYP6B1V3* 基因在进化上居于 *CYP6B1V1* 和 *CYP6B1V2* 中间。*CYP6B1V3* 蛋白前 280 氨基酸与 *CYP6B1V2* 相同, 其后 256 氨基酸与 *CYP6B1V1* 蛋白相同, 表明 *CYP6B1V3* 可能通过 *CYP6B1V1* 和 *CYP6B1V2* 等位基因的交换而形成 (Prapaipong *et al.*, 1994)。在家蝇中发现 *CYP6D1* 的 5 个等位基因 (Tomita *et al.*, 1995), 它们的 cDNA 序列有 97.61%~99.10% 的相同性, 编码蛋白的氨基酸有 98.06%~99.81% 相同。抗性 LPR 家蝇品系的 *CYP6D1* 分别有 8, 11, 7, 6~7 个氨基酸与 CS, aabys, ISK, Rutger 品系家蝇的等位基因不同, 氨基酸替代的位置出现在 *CYP6* 家族 P450 的两个高度可变的区域, 其中在残基 218、220、225、227 位置的氨基酸替代靠近推定的底物结合区 (Tomita *et al.*, 1995)。

*CYP6B1V1* 和 *CYP6B1V2* 同工酶对线型呋喃香豆素具有几乎相同的代谢活性, 似乎表明中间类型的 *CYP6B1V3* 同工酶可能有与 *CYP6B1V1* 和 *CYP6B1V2* 相似的代谢能力 (Prapaipong *et al.*, 1994)。*CYP6D1* 等位基因氨基酸的不同是否导致对拟除虫菊酯农药不同的催化活性, 尚待证实 (Tomita *et al.*, 1995)。

除在家蝇、香芹黑凤蝶存在遗传多态现象外, 在烟草天蛾中也发现 *CYP4L1*、*CYP4M1*、*CYP4M2* 基因的等位基因 (Snyder *et al.*, 1995)。

## 8.2 昆虫细胞色素 P450 的表达

昆虫 P450 酶系组成及酶活性水平上的整体表达规律已有较详细的阐述 (Agosin, 1985; Hodgson, 1985), 以下的论述是有关特定 P450 基因在 mRNA 和蛋白水平的表达。

昆虫 P450 表达调控表现出较大的变异, 有些 P450 可以在所有生活阶段中表达 (如 *CYP4D1* 和 *6A1*), 而有些 P450 仅在少数组织中存在, 而其他却无处不在 (*CYP6D1*)。

表 8.2 昆虫 P450 的表达 (Scott et al., 1998)

基因型	种名	生活史				组织	性别	
		胚胎	幼虫	蛹	成虫		雄	雌
CYP4C1	<i>Blaberus discoidalis</i>	NI	NI	×	+	FB	+	NI
CYP4D1	<i>Drosophila melanogaster</i>	+	+	+	+	NI	+	+
CYP4E1	<i>D. melanogaster</i>	—	+	—	+	V	NI	NI
CYP4L1,2	<i>Manduca sexta</i>	NI	±	±	±	MG,FB	NI	NI
CYP4M1	<i>M. sexta</i>	NI	+	+	+	MG,FB	NI	+
CYP4M2	<i>M. sexta</i>	NI	+	+	+	MG,FB	NI	+
CYP4M3	<i>M. sexta</i>	NI	+	+	±	MG,FB	NI	+
CYP6A1	<i>M. domestica</i>	+	+	+	+	G,FB	+	+
CYP6A2	<i>D. melanogaster</i>	NI	NI	NI	+	FB, MG, MT	NI	NI
CYP6A8,9	<i>D. melanogaster</i>	NI	NI	NI	+	NI	NI	NI
CYP6A3,6	<i>M. domestica</i>	NI	NI	NI	+	NI	NI	NI
CYP6C1,2								
CYP6A4,5	<i>M. domestica</i>	NI	+	NI	+	NI	NI	NI
CYP6B1,3	<i>Popilio polyxenes</i>	NI	+	NI	NI	MG	NI	NI
CYP6B2	<i>H. armigera</i>	—	+	—	—	MG, HF, FB	NI	NI
CYP6B4,5	<i>P. glaucus</i>	NI	+	NI	NI	MG	NI	NI
CYP6D1	<i>M. domestica</i>	—	—	—	+	FB, PI, RS 等	+	+
CYP9A1	<i>Heliothis virescens</i>	NI	+	NI	NI	FB, G	NI	NI
CYP18	<i>D. melanogaster</i>	NI	+	+	NI	BW, G	NI	NI
CYP28A1	<i>D. mettleri</i>	NI	+	NI	NI	NI	NI	NI
CYP28A2	<i>D. mettleri</i>	NI	+	NI	NI	NI	NI	NI
CYP28A3	<i>D. nigrospiracula</i>	NI	+	NI	NI	NI	NI	NI

注: +: 表达; -: 不表达; ±: 不确定; NI: 未知; BW: 体壁; FB: 脂肪体; HF: 前肠; G: 肠; MG: 中肠; MT: 马氏管; PT: 后肠; RS: 生殖系统; V: 内脏。

### 8.2.1 P450 基因表达的生长发育调节

昆虫 P450 基因的表达表现出生长发育控制, 一般认为其表达与其功能的需要相一致。与外来物质代谢有关的家蝇 CYP6A1 的 mRNA 在家蝇幼虫和成虫中均有表达, 而卵和蛹期的 mRNA 含量非常之低 (Carino et al., 1994)。与拟除虫菊酯抗性有关的 CYP6D1 mRNA 仅能在成虫期表达 (Scott et al., 1996) 而难于解释。果蝇 CYP4D1 基因的 mRNA 在其生活史的各个阶段都有表达, 末龄幼虫达到最高, 化蛹始迅速下降 (Gandi et al., 1992)。目前对 CYP4D1 蛋白的生理作用知之甚少, 根据其 mRNA 的表达方式推测其代谢活性为幼虫和化蛹初期所需。烟草天蛾 (*Manduca sexta*) CYP4 家族基因的表达也表现出发育调节: 中肠 CYP4 mRNA 含量在幼虫取食盛期、游动中期 (mid-wandering)、预

蛹和蛹期表达较高;除 *CYP4M1* 外, *CYP4* mRNA 的表达在成虫中都很低(Snyder *et al.*, 1995)。

### 8.2.2 P450 基因表达的组织特异性

从烟草天蛾克隆的 *CYP4* 家族的 5 个 P450 基因中, *CYP4L1* 仅在脂肪体中表达, *CYP4M3* 和 *CYP4L2* 仅在中肠中存在, 另外两个基因(*CYP4M1*, *CYP4M2*)则在上述两种组织中均有表达(Snyder *et al.*, 1995)。

### 8.2.3 P450 基因表达的品系差异

抗性品系昆虫往往表现出 P450 的组成型超量表达(constitutional overexpression)。对有机磷农药抗性的 Rutgers 品系家蝇 *CYP6A1* mRNA 至少高出感性 *sbo* 品系的 10 倍, 这种超量表达在成虫和幼虫中都有表现(Carino *et al.*, 1994)。拟除虫菊酯农药抗性的 LPR 品系家蝇腹部的各组织中 *CYP6D1* mRNA 的表达 10 倍于感性 CS 品系(Scott, 1996)。在对 DDT 抗性的 91-R 果蝇 *CYP6A2* mRNA、编码蛋白 P450-B1 分别是感性品系的 20~30 和 20 倍(Waters *et al.*, 1992a)。

### 8.2.4 P450 基因表达的可诱导性

诱导似乎是 P450 的共同特征, 但诱导具有选择性、复杂性和重叠性的特点(Scott *et al.*, 1996)。

家蝇 *CYP6A1* mRNA 和 *CYP6D1* 编码的蛋白 P450<sub>LPR</sub> 均可被苯巴比妥和增效醚(pbo)诱导, 但均不被萘、环戊二烯类(如狄氏剂或艾氏剂)、 $\beta$ -萘黄素( $\beta$ -naphthoflavine)诱导, 而乙醇仅能诱导 *CYP6A1*(Scott *et al.*, 1996)。香芹黑凤蝶 *CYP6B1* 基因 mRNA 的诱导剂花椒毒素(xanthotoxin)也可诱导 P450<sub>LPR</sub>(Scott *et al.*, 1996)。从棉铃虫中肠用 *CYP6B2* cDNA 为探针鉴定出两个大小不等的 mRNA(2.1kb, 1.8kb), 氯菊酯仅诱导大 mRNA 的表达且表现出剂量效应:当棉铃虫取食高含量氯菊酯(permethrin)的食物, 其大 mRNA(2.1kb)含量是对照的 5 倍, 当取食低含量氯菊酯的食物时, 大 mRNA 含量只增至对照的 2 倍;而苯巴比妥对该两种 mRNA 的表达均有影响:1.8kb mRNA 和 2.1kb mRNA 分别是对照组的 4 倍和 2 倍(Wang *et al.*, 1995)。

*CYP4* 家族的烟草天蛾 P450 基因的表达也表现出可诱导性的特征。中肠 *CYP4M3* 的 mRNA 可分别被 2-十三烷酮(tridecanone), 2-十一烷酮(undecanone)和安妥明(clofibrate)诱导 5 倍、3 倍、15 倍, 但 *CYP4M2* 不受这些物质的影响(Snyder *et al.*, 1995)。

蜚蠊(*Blaberus discoidalis*)脂肪体的 *CYP4C1* 可被神经内分泌肽激素(hypertrehalosemic hormone, HTH)的诱导。HTH 由蜚蠊头部的心侧体分泌产生, 它的主要作用是促进脂肪体糖原分解以产生合成海藻糖的前体。Northern 杂交分析表明, 去头的蜚蠊中 *CYP4C1* mRNA 含量极低, 当施用 100pmol 的 HTH 时, mRNA 可增加 50 倍(Bradfield *et al.*, 1991)。

饥饿处理对有些 P450 基因也有一定的诱导作用,这在 CYP4 家族的几个成员中发现,它们是:蜚蠊脂肪体 CYP4C1 (Bradfield *et al.*, 1991), 烟草天蛾中肠 CYP4L2, CYP4M1 基因(Snyder *et al.*, 1995)。

### 8.2.5 昆虫 P450 基因表达的调控机制

有关昆虫 P450 基因表达调控机制的认识是源于对 P450 的诱导及抗性与感性昆虫品系基因结构和表达的比较,这方面的工作集中在对杀虫剂或植物次生性物质抗性有关的 CYP6A1, CYP6A2, CYP6B1, CYP6D1 基因的研究。

#### 8.2.5.1 家蝇 CYP6A1 基因表达可能受反式作用因子的调节

1989 年 Feyereisen 等从苯巴比妥诱导的家蝇中克隆了一个 P450cDNA (Feyereisen *et al.*, 1989), 该基因编码的 CYP6A1 蛋白可以氧化环戊二烯类杀虫剂 (Andersen *et al.*, 1994)。CYP6A1 基因位于染色体 V, 其转录起始位点的上游是一些与苯巴比妥诱导有关的序列, 其编码序列被位于 Glu364 密码子的单一内含子 (60bp) 所打断 (Cohen *et al.*, 1994)。用克隆的 CYP6A1 cDNA 作探针从 Rutgers-sbo 品系家蝇进行 CYP6A1 mRNA 的序列测定, 发现 mRNA 在抗性 Rutgers 家蝇的组成性表达至少高出 sb0 家蝇的 10 倍 (Gandi *et al.*, 1992)。通过 Rutgers 品系与多重标志的 sb0 品系家蝇的杂交试验显示, CYP6A1 在抗性品系家蝇的超量表达是受位于染色体 II 的不完全显性基因座所控制 (Feyereisen *et al.*, 1989)。Rutgers 和 sb0 品系家蝇 CYP6A1 的 5' 上游区完全相同, 排除了 CYP6A1 存在顺式作用突变而认为这种超量表达是反式作用因子突变的结果。这一反式作用因子负调节 (抑制) CYP6A1 的表达, 突变解除了这一抑制。该突变可能是: ① 影响基因表达的启动子区的突变; ② 调节基因编码区的突变, 使开放读框中断, 或指导一个修饰蛋白的合成以使此蛋白不能与 CYP6A1 基因的顺式调节元件结合, 或影响与其他转录调节因子的相互作用; ③ 突变影响反式作用因子翻译后修饰, 而导致其功能的丧失 (Feyereisen *et al.*, 1995)。

#### 8.2.5.2 CYP6A2 基因的表达可能涉及转录后机制

CYP6A2 是从果蝇中分离的基因, 编码 P450-B1 蛋白。在 DDT 抗性的 91-R 品系的 mRNA 的表达是感性 91-C 品系的 20~30 倍, P450-B1 蛋白在 91-R 品系的表达是 91-C 的 20 倍 (Sundseth *et al.*, 1989), 两品系的 mRNA 和 P450-B1 蛋白的表达的这种线性关系表明, 翻译后机制可能并不起作用 (Waters *et al.*, 1992b)。从 91-C 和 91-R 品系果蝇得到的 CYP6A2 mRNA 大小不同, 预示在该两品系果蝇中 P450 CYP6A2 结构存在差异。通过基因组 DNA 克隆限制性酶谱和 DNA 序列分析表明 91-C 和 91-R 品系 CYP6A2 基因结构的差异在 3'-端。91-C 品系 P450 CYP6A2 基因的 3'-末端有一 513bp 序列在 91-R 品系果蝇中不存在, 这一序列称为转座因子 (transposable element) 17.6 的长末端重复 (long terminal repeat, LTR), 定位在转录序列的 3'-端非翻译区, 其明显的效应是将基因的多腺苷酰化信号和 PolyA 位点向下游移动 500bp 以上 (Waters *et al.*, 1992b)。由 LTR 的特征及其定位推测 CYP6A2 基因表达调控涉及 mRNA 稳定的转录后机制 (Tomita *et*

al., 1995)。LTR 的存在导致比 91-C 品系果蝇 mRNA 更长的嵌合 mRNA 的合成,而嵌合的转录物是不稳定的,很快被降解。且嵌合 mRNA 不能有效地被多腺苷酰化,这本身也就降低了 mRNA 的稳定性(Waters et al., 1992)。

对以上观点,Delpuech 等(1993)提出了不同的看法。他们通过对代表 24 个种群和广泛地理分布的 22 个黄猩猩果蝇(*Drosophila melanogaster*)和 9 个 *D. simulans* 系的果蝇分析,发现在 *D. melanogaster* 25% 的抗性品系和 30% 的感性品系存在 LTR。该作者认为 LTR 不可能是果蝇对 DDT 敏感性的原因,敏感 91-C 果蝇 LTR 的存在仅是果蝇中广为分布的多态性的一个例子,而与 DDT 抗性无关(Delpuech et al., 1993)。

在 91-R 的 CYP6A2 基因存在一个 96bp 序列,位于编码序列下游,它的功能尚不清楚,不能排除这一序列起加强子的作用(Waters et al., 1992)。

### 8.2.5.3 顺式调控元件可能调节 CYP6B1V3 的表达

CYP6B1V3 是从香芹黑凤蝶分离的基因,它与昆虫对呋喃香豆素的代谢有关。香芹黑凤蝶在接触花椒毒素和香柠檬烯 24 h 后,CYP6B1V3 转录物的表达分别被诱导 7 倍和 2 倍,而角状呋喃香豆素当归根素(angelicin)不诱导 CYP6B1 的转录。这些结果表明,CYP6B1 基因被呋喃香豆素的转录调节具有等级性(hierarchy):线状的花椒毒素本身可被 CYP6B1 基因产物所代谢,强烈诱导 CYP6B1 转录,香柠檬烯也可被 CYP6B1 蛋白代谢,但诱导程度低得多;而角型呋喃香豆素的当归根素不被 CYP6B1 代谢,也不诱导该基因的转录(Propaipong et al., 1994)。

用包含 CYP6B1V3 基因 RNA 起始位点和报告基因(report gene)CAT 所构建的 838CYP-CAT 转录融合体,转染到与香芹黑凤蝶近缘关系较远的昆虫 sf9 细胞中,被转染的细胞具有高的 CAT 活性,而无该启动子的亲本载体,没有检测到 CAT 活性(Propaipong et al., 1994)。通过加入不同量的花椒毒素于 838CYP-CAT 转染的细胞与对照相比,CAT 活性增强,表明该 CYP6B1V3 基因启动子至少保持部分对花椒毒素诱导起重要作用的顺式元件(Propaipong et al., 1994)。通过序列分析,CYP6B1V3 基因的启动子序列包含 TATA 和 CAAT 盒,分别位于转录起始位点前 30 和 129 个核苷酸处(Propaipong et al., 1994)。其他元件在呋喃香豆素对 CYP6B1V3 的转录诱导中的作用尚不清楚(Propaipong et al., 1994)。

### 8.2.5.4 顺式和反式因子可能共同调节 CYP6D1 基因的表达

CYP6D1 基因是从家蝇中分离的另一 P450 基因,它与家蝇对拟除虫菊酯农药的抗性有关(Scott, 1996b)。CYP6D1 mRNA 在抗性 LPR 品系的表达 10 倍于感性 CS 品系,CYP6D1 蛋白在 LPR 品系与 CS 品系相差 9 倍,可见 LPR 品系家蝇 CYP6D1 mRNA 和 CYP6D1 蛋白含量的增加是相似的(Scott, 1996)。Southern 印迹分析证明,CYP6D1 基因表达不是基因扩增造成的(Scott, 1996; Tomita et al., 1995)。这些结果表明,LPR 品系家蝇 CYP6D1 蛋白含量的上升是由于转录增加或 mRNA 稳定或两者共同作用的缘故(Tomita et al., 1995)。

CYP6D1 基因位于 1 号染色体,其超量表达(mRNA 和蛋白质)被证明是与位于 1 号染色体和 2 号染色体上的调控因子的综合作用相关,表明 CYP6D1 在 LPR 品系的表达

增加同时受位于 1 号染色体上因子的顺式调节和 2 号染色体上因子的反式调节 (Scott, 1996)。

敏感品系家蝇 *CYP6D1* 基因的 mRNA 可被苯巴比妥诱导, 而抗性 LPR 品系无此现象。诱导是受位于 2 号染色体的因子所调控 (Liu and Scott, 1997b), 这一因子反式作用于 1 号染色体上的 *CYP6D1* 基因。值得注意的是, 在 LPR 品系家蝇中控制 *CYP6D1* 的超量表达的因子也位于 2 号染色体上, 两者可能为同一因子 (Liu and Scott, 1997)。

## 8.3 昆虫细胞色素 P450 的功能

至今, 人们发现昆虫细胞色素 P450 酶系存在两大功能类型, 即对内源物质和外源物质代谢。

### 8.3.1 对外源物质的代谢

定位于细胞微粒体分级中的 P450 酶系, 主要作用是对外源性物质的代谢, 由于 P450 的这种功能对生物体而言在大多数情况下起解毒作用, 因此常将 P450 酶系归为解毒酶。许多事例表明 P450 酶系对杀虫剂及植物毒素的代谢作用是大多数昆虫产生抗药性和对寄主植物的适应性的主要机制。

#### 8.3.1.1 在昆虫取食中的作用

所有生物都为生存而与逆境抗争, 昆虫也不例外。草食昆虫在取食植物获得能量的同时, 也摄入植物中对其生长不利的化学物质。据估计, 所有植物都包含一定种类的防御化合物 (Rhodes and Gates, 1976), 这些防御化合物对昆虫来说存在一定程度的急性或慢性毒性, 可以使昆虫致死或使昆虫发育或繁殖异常。为了取食, 昆虫必须有一定的适应机制 (Jones, 1972)。数百万年来, 昆虫对大量的植物次生性物质进行了长期不断地适应, 形成了多种适应对策: 行为的、生理的或生化的, 避毒、贮毒、排毒或解毒, 其中代谢解毒是大多数昆虫对植物次生物质的适应机制。代谢解毒过程是由昆虫体内一系列称为解毒酶的催化作用而完成的, 其中具普遍而重要意义的是 P450 酶系。

Krieger 等 (1972) 首次提出 P450 酶系在昆虫对寄主植物适应中具有重要的意义, 这一看法源于他们对 35 种鳞翅目幼虫中肠中加单氧酶 (艾氏剂环氧化酶) 的活性与其取食植物的科的数量存在相关性的观察结果 (表 8.3), 由此认为多食性昆虫因暴露于较多种类或数量的植物次生物质而比寡食性又比专食性昆虫具有更高的 P450 酶系活性。Krieger 等 (1972) 的研究带动了许多有关解毒酶的代谢活性与寄主植物防御物质相互关系研究的开展。Rose (1985) 用更多的鳞翅目昆虫重复 Krieger 等的实验, 发现昆虫的寄主范围与昆虫的加单氧酶活性并不存在相关性, 但却指出寄主植物中的一些化学成分比食性更能表明加单氧酶活性的高低 (Rose 1985), 因为取食单萜类物质含量高的昆虫, 往往具有较高的加单氧酶活性。虽然 Krieger 的研究结果曾经受到质疑 (Gould 1984; Rose, 1985), 但近 30 年来, 大多数研究结果支持 P450 酶系在植物毒素解毒中起重要作用。

表 8.3 鳞翅目幼虫中肠环氧化酶活性与食性的关系 (Krieger *et al.* 1972)

幼虫食性(植物属数)	测定昆虫种数	蛋白中艾氏剂环氧化酶/[pmol/(min·mg)]
单食性(1)	8	20.4±9.1
寡食性(2~10)	15	90.0±33.6
多食性(>11)	12	297.4±65.9

P450 酶系参与植物防御物质的代谢已有实验证明, 随底物分子的结构不同, 催化反应的产物各异。在昆虫-植物相互关系中起作用的 P450 所催化反应的类型内见下表 8.4 (Brattsten, 1992)。

表 8.4 细胞色素 P450 催化的反应

反应	底物举例
碳羟基化	
脂族	长叶薄荷酮(pulegone)
芳族	苯并芘(benzo pyrene)
N-脱烷基	吗啡(morphine)
O-脱烷基	可待因(codeine)
S-脱烷基	涕灭威(aldicarb)
π-键氧化作用	
脂族环氧化	除虫菊脂 I(pyrethrin 1)
芳族环氧化	花椒毒素(xanthotoxin)
氧化脱硫	甲基对硫磷(methyl parathion)
非共享电子对的氧化作用	
N-氧化	烟碱(nicotine)
S-氧化	甲拌磷(phorate)

### (1) 碳的羟基化

细胞色素 P450 通常进攻碳原子, 很少进攻杂原子。碳的氧化作用通常是羟基化过程(图 8.1)。如果邻近杂原子的碳被氧化, 其反应可能是在被烷基取代的 N、O 或 S 原子上发生脱烷基作用(图 8.2)。细胞色素 P450 也可进攻邻近杂环氮上的碳原子(图 8.3), 如烟碱和吡咯双烷类(pyrrolizidine) 生物碱的代谢, 也可进攻杂环氧上的碳原子(图 8.4)如花椒毒素。

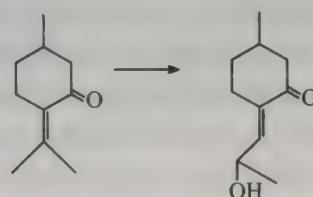


图 8.1 碳的羟基化作用

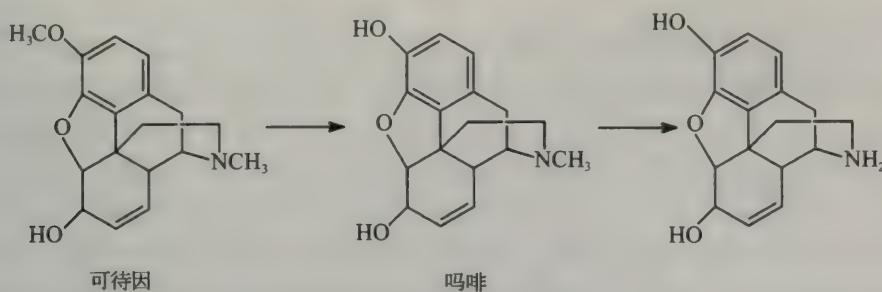


图 8.2 N,O-脱甲基作用

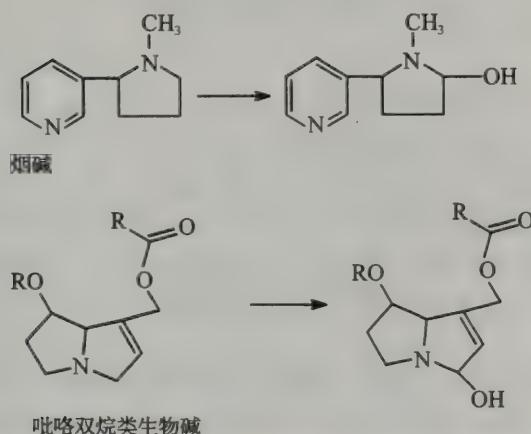


图 8.3 邻近杂原子 C 的羟基化作用

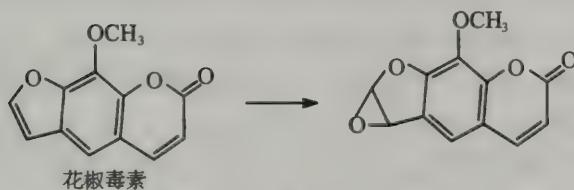


图 8.4 杂环氧上 C 的环氧化

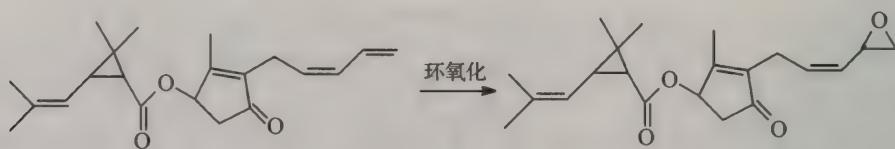
### (2) $\pi$ -键氧化

这些反应是双键的环氧化，产生脂族烃环氧化物或芳族烃环氧化物。这些产物往往具有高度的反应性，可能与生物细胞大分子如蛋白、RNA、DNA 形成结合物，反应为原毒素的活化作用。但有时环氧化起解毒作用，活化还是解毒取决于底物分子的结构(图 8.5)。

### (3) 非共享电子对的氧化

这些反应往往导致硫酯键氧化成亚砜和砜。叔胺转化为 N-氧化物。N-氧化物烟碱和其他生物碱的主要代谢中间物(图 8.6)，N-氧化作用通常是解毒作用。

P450 酶系在植物防御物质代谢中的作用已得到充分的证明 (Brattsten and Wilkin-



除虫菊酯 I



图 8.5 酯族和芳族碳的环氧化作用

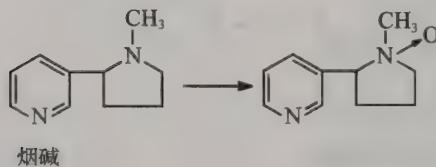


图 8.6 N-氧化作用

son, 1977; Frank and Fogelman, 1992), 但鉴定参与植物防御物质代谢的单个 P450 是很困难的(Scott *et al.*, 1998)。近年来有 3 个系统提供了 P450 参与昆虫对寄主植物防御物质代谢有关的分子信息。

- 1) 果蝇-仙人掌系统 Fogelman 等(1997)发现, 仙人掌中的防御物质对大多数昆虫种类是有毒的, 但其中却生活着几种果蝇, 研究认为这些栖息于沙漠中的果蝇具有取食仙人掌的能力。P450 诱导可能是这种适应性的重要机制。从 *D. mettlen* 中发现 P450 的 CYP28 家族, 这些 P450 可被仙人掌的生物碱诱导, 从而推测这些 P450 可能参与这些毒素的代谢(Danielson *et al.*, 1997)。
- 2) 呋喃香豆素- CYP6B 家族系统 昆虫 P450 酶系与寄主植物适应性的关系研究得最为深入的是 CYP6B 家族。呋喃香豆素发现于至少 8 种植物科中, 它们对大多数生物具有较高的毒性, 包括细菌、植物、鱼、鸟类和哺乳动物, 因为它们光活化后可以与 DNA 上的嘧啶碱基直接发生不可逆转的反应(Berenbaum and Feeny, 1981; Berenbaum, 1991)。在植物中存在两种类型的呋喃香豆素, 即线型如花椒毒素、香柠檬烯、角型如当归根素(angelicin) 和牛防风定(sphondin)。这些植物尽管存在这种防御物质, 但凤蝶属(*Papilio*)昆虫仍可以取食含有这类物质的植物, 其中香芹黑凤蝶几乎专一性取食含呋喃香豆素的植物, 且可以耐受食物中含量高达 0.1% 的花椒毒素(Berenbaum, 1991)。研究发现这种昆虫的 P450 加单氧酶可以解毒花椒毒素(Bull *et al.*, 1986), 其代谢活性可被花椒毒素诱导为对照的 5 倍(Cohen *et al.*, 1989)。其诱导作用具有一定的特异性, 除花椒毒素外, 其他一些结构相关的线型呋喃香豆素具有一定程度的诱导, 而角型呋喃香豆素以及其他一些化合物和苯巴比妥却不是诱导剂(Berenbaum *et al.*, 1990)。

从该昆虫中分离出可被花椒毒素选择性诱导 (Hung *et al.*, 1995; Prapaipong *et al.*, 1994) 的 P450 基因 *CYP6B1* (Cohen *et al.*, 1992)。通过用杆状病毒表达系统在鳞翅目昆虫细胞系中表达 *CYP6B1V1* 和 *CYP6B1V2* 表明, 这两个等位基因编码的 P450 可以代谢线型呋喃香豆素而对当归根素和牛防风定无作用 (Ma *et al.*, 1994)。这提供了 *CYP6B1* 在花椒毒素代谢解毒以及昆虫对植物防御物质忍受性中起作用的明确证据。已知香芹黑凤蝶可以代谢角型呋喃香豆素, 预示该昆虫还存在其他的 P450。Hung 等 (1995) 从香芹黑凤蝶克隆了第二个 P450 基因 *CYP6B3*, 它与 *CYP6B1* 具有 88% 的氨基酸序列相同性, 可被线型或角型呋喃香豆素所诱导, 但 *CYP6B3* 的底物还未见报道。从以上事实中, Berenbaum 等指出: 具有对某一特定化学成分的高诱导活性是为草食者具有对含这类化学成分寄主的一种适应机制 (Berenbaum *et al.*, 1996)。香芹黑凤蝶对含毒素的寄主植物的适应, 可以通过两个途径即具有解毒作用的 P450 的多样性以及响应呋喃香豆素的调控来实现 (Scott *et al.*, 1998)。

3) 烟草天蛾-烟碱系统 在 P450 与寄主植物防御化合物关系的研究中, P450 的诱导占有中心地位 (Brattsten, 1979; Yu, 1986)。草食昆虫取食不同寄主植物, 其 P450 含量或 P450 酶系活性显著不同 (Yu, 1986)。诱导在许多昆虫中为一普遍的现象。

P450 酶系的诱导可以影响昆虫的行为和对有毒物质的取食量, 例如烟草天蛾 (*M. sexta*) 对尼古丁的代谢是由 P450 酶系催化的。尼古丁诱导 P450 是该昆虫取食烟草的关键, 烟草天蛾受食物中尼古丁的严重影响。在 P450 酶系未被诱导时明显抑制取食活动, 经诱导后尼古丁的消耗上升, 再用 P450 的抑制剂处理昆虫时其尼古丁的消耗下降。这一现象显示了 P450 诱导与尼古丁消耗的直接因果关系 (Snyder and Glendinning, 1996)。从烟草天蛾的中肠中克隆的两个 P450 基因 *CYP4M1* 和 *CYP4M3* 可以被食物中的尼古丁诱导, 但对脂肪体无作用 (Snyder *et al.*, 1995)。值得注意的是, 该两基因还受  $\alpha$ -十三烷酮和  $\alpha$ -十一烷酮的诱导, 而这两个化合物是烟草天蛾的另一寄主野生番茄中的有毒成分。

### 8.3.1.2 在昆虫抗药性中的作用

杀虫剂抗性是害虫防治的一大障碍, 由抗性引发的诸如农药使用次数和剂量增加, 产量降低, 环境污染以及虫媒人畜疾病的流行等问题已给人类带来巨大灾难 (Scott, 1996)。抗性治理作为害虫有效防治的关键, 已引起包括生产者、科学家和政府部门的高度重视。

抗性机制的了解是抗性治理的基础 (Scott, 1996), 有关抗性机制的研究已得到广泛的开展, 多年来的研究结果表明, 昆虫产生抗药性有不同的机制。已公认的抗性机制包括: 对杀虫剂暴露的减少, 对杀虫剂代谢作用的增强以及靶部位敏感性的降低等。其中 P450 加单氧酶系 (简称 P450 酶系) 对杀虫剂代谢作用的增强已证明是大多数重要害虫对杀虫剂产生高水平抗性和交互抗性的主要原因 (Scott, 1996)。

发现抗性与 MFO 有关的证据首先来自间接的推测, 即通过研究一些增效剂 (如氧化胡椒基丁醚, 增效散等) 的作用才发现的。1960 年 Sun 和 Johnson 发现这些化合物能抑制艾氏剂的环氧化作用和硫逐磷酸酯杀虫剂的活化作用。Hodgson 和 Casida (1961) 也发现它们能抑制氨基甲酸酯类的氧化作用。Eldefraw 等在 1960 年证明, 以西维因和增效散混合处理时能消除家蝇对西维因的抗性。

MFO 酶系在抗性中极为重要的直接证据来自 MFO 的离体测定。主要通过: ①杀虫剂氧化代谢的直接测定, ②模型底物氧化代谢的测定, ③对 MFO 酶系的主要组成如细胞色素 P450 水平的测定 ④P450 光谱特征的变化。研究结果表明, 抗性的发展普遍与微粒体氧化作用增强有关(Wilkinson, 1983)。

以 MFO 活性增加的机制产生抗性的昆虫, 除增强了对靶标杀虫剂的代谢外, 还会加强对靶标杀虫剂结构并不相关的杀虫剂的代谢, 这是因为这些杀虫剂可以通过一个或几个微粒体氧化途径被降解, 这为交互抗性提供了一个很好的解释(Wilkinson, 1983)。

代谢抗性的化学本质是杀虫剂代谢活性的增强, 归因于相关酶在数量或质量上的改变, 可能涉及的机制包括基因扩增、酶基因突变以及基因转录的增强等。与蚜虫和蚊虫等酯酶介导的抗性不同, 未发现 P450 介导的抗性是由基因扩增所引起, 调控基因的突变引起的 P450 的超量表达可能是 P450 介导抗性的主要机制。

### (1) 家蝇

1) LPR 品系 LPR(learn pyrethroid resistant)品系家蝇是经氯菊酯选择的品系, 对大多数常用拟除虫菊酯类杀虫剂表现出高水平的抗性。许多证据表明, 加单氧酶是 LPR 品系对拟除虫菊酯类杀虫剂抗性的重要机制, 包括: ①离体研究发现在加单氧酶介导的对氯菊酯、溴氰菊酯或氯氰菊酯的解毒作用上, LPR 品系比敏感品系高约 10 倍; ②在溴氰菊酯体内代谢作用上, LPR 品系比敏感品系增强; ③用 P450 的抑制剂增效醚可以抑制氯菊酯的抗性(从 5900 倍降低 32 倍)。P450 介导的解毒作用与家蝇 1 号和 2 号染色体有关。

从 LPR 品系家蝇中纯化出 P450(P450lpr), 由其部分肽序列设计简并引物分离了其编码基因 CYP6D1, 免疫抑制实验证明 CYP6D1 是 LPR 品系家蝇对溴氰菊酯和氯氰菊酯代谢的主要 P450。代谢中间物分析显示 CYP6D1 是在上述拟除虫菊酯的苯氧苄基分子(phenoxybenzyl)的单一位点上起作用。用  $b_5$  抗血清证明 LPR 品系家蝇微粒体 CYP6D1 介导氯氰菊酯的代谢需要细胞色素  $b_5$ (Liu and Scott, 1996)。Northern 印迹分析证明, LPR 品系 CYP6D1 mRNA 表达水平比敏感品系家蝇高 10 倍, 这与微粒体蛋白抗性品系高出敏感品系 8 倍的结果相一致。基因组 DNA 杂交(用 CYP6D1-cDNA 探针)的 Southern 印迹分析显示 CYP6D1 mRNA 在 LPR 品系家蝇中水平增加不是基因扩增的结果(Tomita and Scott, 1995)。等位基因特异性 PCR 方法实验证明 CYP6D1 位于 1 号染色体上(Liu et al., 1995)。用转录抑制剂(放线菌素 D)注射于 LPR 品系家蝇和敏感 aabys 家蝇, 在不同时间分离 mRNA 的定量结果表明(放线菌素 D 可以抑制两个品系转录过程), CYP6D1 mRNA 的高表达不是 mRNA 稳定的结果(Liu and Scott, 1998)。

连缀转录分析(run-on transcription assay)证明 CYP6D1 mRNA 的丰度在 LPR 品系比 aabys 高致 10 倍, 这与 Northern 杂交(Liu and Scott, 1996; Tomita et al., 1995)的结果相一致。这第一次直接证明了增强转录是杀虫剂抗性的原因(Liu and Scott, 1998)。

CYP6D1 转录增强是由顺式和反式调控因子介导的(Liu et al., 1995)。因为 CYP6D1 转录速率的增加是由 1 号和 2 号常染色体决定的。有关 CYP6D1 转录增强的机制现在还不清楚, 对比 LPR 品系家蝇以及 5 个拟除虫菊酯敏感品系的 CYP6D1 5' 侧翼区存在一些差异, 5' 侧翼区的不同可能是 CYP6D1 在不同品系家蝇中的差别表达中起作用(Scott et al., 1999)。

从 LPR 及其他 4 个家蝇品系的 *CYP6D1* 序列对比分析发现,推导的蛋白序列 LPR 品系与 cs, aabys, ISK 和 Rutgers 品系分别有 8, 11, 7 和 6~7 个氨基酸不同(Tomita *et al.*, 1995)。其中有 5 个氨基酸在 cs, aabys, IKS 和 Rutgers 相同,但与 LPR 品系家蝇有别,即 Asp→Ala (150), Ile→Leu (153), Thr→Ser (165), Glu→Gln (128), Met→Ile (227) (Tomita *et al.*, 1995)。氨基酸取代出现在 6 家族细胞色素 P450 的两个高度可变区,且改变的残基 218、220、225 和 227 靠近推定的底物结合区(Gotoh and Fujii-Kuriyama, 1989)。这些 *CYP6D1* 蛋白的氨基酸差异是否会导致对除虫菊酯杀虫剂催化活性的不同,还有待进一步证明。

2) Rutgers 品系家蝇 Rutgers 品系家蝇最初是用二嗪磷选择,表现出对二嗪磷以及其他杀虫剂的抗性。从 Rutgers 家蝇中克隆了 *CYP6A1*,是第一个克隆的昆虫 P450 基因(Feyereisen *et al.*, 1989)。Northern 印迹分析结果表明,Rutgers 品系中 *CYP6A1* 是敏感品系家蝇的 3 倍,在 LPR 品系中表达量更高(Carino *et al.*, 1992)。Southern 印迹分析显示 *CYP6A1* 的表达增加不是基因扩增的结果(Carino *et al.*, 1994; Feyereisen *et al.*, 1995)。

从现有资料来看,还不能确定 *CYP6A1* 与杀虫剂抗性有关。有一些抗性品系家蝇中 *CYP6A1* mRNA 的含量比敏感品系高,但也有相反的情况如 LPR 品系的 *CYP6A1* mRNA 比 Rutgers 更高,而 LPR 品系对二嗪磷的抗性水平比 Rutgers 品系家蝇低。现在还不知 *CYP6A1* 蛋白是否在抗性品系家蝇中含量更高,而且也未见报道 *CYP6A1* 可以解毒 Rutgers 品系家蝇产生加单氧酶介导抗性的杀虫剂,如二嗪磷。

Rutgers 和 aabys 的 *CYP6A1* 等位基因十分相似,在 507 个氨基酸中仅有 5 个不同(Cohen *et al.*, 1994)。而 Rutgers 和 SBO 品系具有相同的 *CYP6A1* 核苷酸序列(Cohen *et al.*, 1994)。

Guzov 等(1998)从 Rutgers 品系家蝇中克隆了一线粒体 P450 基因 *CYP12A1*,并在大肠杆菌中得到表达,从而纯化了表达的 *CYP12A1* 蛋白。该蛋白与牛线粒体的电子供体构成的重组酶系可以代谢许多种杀虫剂和抗生素,但对保幼激素、蜕皮激素和脂肪酸等内源性底物无代谢活性。*CYP12A1* 基因作图在 2 号染色体上,与杀虫剂代谢作用的微粒体 *CYP6A1* 相同,这表明线粒体 P450 可能参与外源物质的代谢。*CYP12A1* 与昆虫抗药性的关系还未见报道。

## (2) 果蝇

91-R 品系果蝇(*Drosophila melanogaster*)在实验中用 DDT 选择,它对 DDT 的抗性小于 10 倍(Dapkus and Murrell, 1997),抗性受多因素的控制,涉及 3 条染色体。91-R 还表现出对马拉硫磷(malathion)的交互抗性(100 倍),其抗性机制不明确。

果蝇 P450 的电泳呈现两个主要的带,P450s-A 和 P450s-B(Sundseth *et al.*, 1989)。这些 P450 被纯化并用于制备单克隆抗体(Sundseth *et al.*, 1990)。P450s-B 免疫反应蛋白在所有品系中的表达水平相似(Sundseth *et al.*, 1989; Waters *et al.*, 1992b)。用 P450s-B 特异性单克隆抗体筛选文库,获得了包含 P450(*CYP6A2*)的克隆(Waters *et al.*, 1992b)。Northern 印迹分析表明 *CYP6A2* 在 91-R 中表达较敏感品系高(Waters *et al.*, 1992b),Southern 印迹显示抗性与敏感品系的信号强度相同,表明抗性品系 *CYP6A1* 的增强表达不是因为基因扩增(Waters *et al.*, 1992b)。在敏感品系 *CYP6A2* 的 3'-非翻译

区包含的转座因子(transposable element)17.6 的长末端重复(LPR),而在抗性 91-R 品系家蝇中不存在(Waters *et al.*, 1992b),为此 Waters 等提出 LTR 可能是 CYP6A2 在 91-R 和敏感品系家蝇差异表达的原因(Waters *et al.*, 1992a,b)。随后的研究表明 LTR 的存在与抗性(Delpuech *et al.*, 1993)和 CYP6A2 表达(Dombrowski *et al.*, 1998)不相关。

杆状病毒系统异源表达的 CYP6A2 可以代谢艾氏剂、七氯和二嗪磷(Dunkov *et al.*, 1997),在系统中加入家蝇 P450 还原酶以及  $b_5$  可以加强 CYP6A2 的活性(Dunkov *et al.*, 1997)。值得注意的是二嗪磷产生两种中间体,一种是其活化型,由脱硫作用产生二嗪氧磷(diazoxon),另一种是由酯断裂酶(ester cleavase)氧化形成的解毒产物 2-异丙基-4-甲基-6-羟基嘧啶(2-isopropyl-4-methyl-6-hydroxy Primidine)(Dunkov *et al.*, 1997)。一个 P450 同时解毒和活化杀虫剂的另一例子是 CYP6D1 可以同时解毒和活化有机磷杀虫剂(Hatano and Scott, 1993)。

比较 5 个 *D. melanogaster* 品系发现,CYP6A2 蛋白含量与二嗪磷抗性水平不相关(Bride *et al.*, 1997)。Paquette 品系中 CYP6A2 含量最高,但仅表现出对二嗪磷抗性的 2 倍(Bride *et al.*, 1997),这表明 CYP6A2 的超量表达不是二嗪磷抗性的主要机制。CYP6A2 具有活化和解毒的双重性,也可能是 CYP6A2 与果蝇抗性水平不相关的一个原因(Dunkov *et al.*, 1997)。

P450s-A 免疫反应蛋白在 91-R 和敏感品系可被 PB 诱导(Fuchs *et al.*, 1994)。用 P450s-B 抗体的免疫印迹法显示 3 条带,在敏感品系,其中 1 条被显著的诱导,而在 91-R 品系中仅轻度诱导(Fuchs *et al.*, 1994)。随后的研究表明 CYP6A2 在敏感和抗性果蝇中均可被诱导,只是敏感品系果蝇被诱导的水平更高(Brun *et al.*, 1996)。

从 91-R 品系果蝇中克隆和测序了 CYP6A8 和 CYP6A9 基因,CYP6A2, A8 和 A9 紧密成簇位于染色体 2R 上;相对于敏感品系,CYP6A8 在 91-R 品系中表达较高(Maitra *et al.*, 1996)。此外,用 RT-PCR 方法从 *D. melanogaster* 中克隆了 12 个 P450 基因片段,并在抗性和敏感品系中发现了其中一些 P450 的等位突变体(Dumkov *et al.*, 1996)。这些 P450 基因及等位突变与抗性的关系还不清楚。

### (3) 德国小蠊

德国小蠊 (*Blattella germanica*) 由加单氧酶介导抗性的研究工作,主要集中在对拟除虫菊酯杀虫剂抗性品系 Munsyana 的研究,该品系来源于施用氯氰菊酯 8 年之久的地方,对氯氰菊酯表现出 82 倍,对毒死蜱 5 倍抗性(Scharf *et al.*, 1997)。用 PBO 仅使氯氰菊酯抗性由 82 倍降低至 76 倍,表明加单氧酶在氯氰菊酯抗性中不起作用或作用很少。最近的研究表明,该品系对氟戊菊酯(fenvalerate)杀虫剂的抗性为 825 倍,用 P450 抑制剂则抗性倍数降至 15~70 倍之间(Wu *et al.*, 1998)。Dong 等(1998)和 Wu 等(1998)认为 Munsyana 对氟戊菊酯的抗性机制包括加单氧酶、水解酶、谷胱甘肽 S-转移酶、降低表皮穿透以及靶标部位的不敏感性等多种机制。离体代谢研究表明,氟戊菊酯代谢产物在抗性品系比敏感品系多,Munsyana 品系微粒体少量依赖 NADPH 的氟戊菊酯代谢可被 PBO 或水解酶抑制剂脱叶磷(s, s, s-tributylphosphorotri thioate, DEF)抑制(Wu *et al.*, 1998)。Munsyana 品系的 P450 含量 4.5 倍于敏感品系,4-氯-N-甲基苯胺的代谢前者是后者的 2.5 倍(Scharf *et al.*, 1998b)。

从 Munsyana 品系德国小蠊中用 HPLC 方法纯化了 P450 MA,用小鼠制备的

P450 MA 多克隆抗性 (Schart *et al.*, 1998b) 免疫印迹揭示抗血清与一个分子质量为 49 kDa 的蛋白结合, 在 Munsyana 抗性品系中比敏感品系表达更高。抗血清抑制 4-氯-N-甲基苯胺的代谢, 但抗血清对拟除虫菊酯代谢的抑制尚未见报道。用氯氰菊酯选择的德国小蠊品系, 其 P450 MA 表达有所下降, 而以毒死蜱选择, P450 MA 表达增加, P450 MA 的表达规律与 4-氯-N-甲基苯胺代谢相同 (Scharf *et al.*, 1998a)。五甲基苯对敏感和抗性德国小蠊 P450MA 均有诱导作用 (Scharf *et al.*, 1998b)。

虽然 P450 MA 在 Munsyana 品系中表现出超量表达满足了 P450 介导抗性的条件之一, 但 P450 MA 是否参与杀虫剂代谢尚不得而知, 因此难以证明 P450 MA 在杀虫剂抗性中的作用。

#### (4) 蝶翅目昆虫

- 1) 烟芽夜蛾 (*Heliothis virescens*) 经过实验室选择, Herbert 品系的烟芽夜蛾对硫双灭多威和氯氰菊酯分别为 7150 倍和 91 倍的抗性 (Rose *et al.*, 1997)。对氯氰菊酯的抗性, 用 PBO 可降低至 59 倍, 该品系总 P450 含量是敏感昆虫的 4 倍, 微粒体对模式底物的代谢也比敏感品系昆虫增强 (Rose *et al.*, 1997)。1997 年从该品系中克隆测序了 P450 基因 CYP9A1。Northern 杂交分析表明 CYP9A1 在敏感品系昆虫中表达低, 用 Herbert 与敏感品系杂交 F1 代的表达稍高 (Rose *et al.*, 1997)。CYP9A1 作图于连锁群 7 (Linkage group 7) (Rose *et al.*, 1997)。CYP9A1 是否与加单氧酶介导的抗性有关还需更进一步的研究。
- 2) 棉铃虫 (*Helicoverpa armigera*) 棉铃虫拟除虫菊酯的抗性机制是一个有争论的问题。早期的工作显示拟除虫菊酯的抗性可被 PBO 抑制, 拟除虫菊酯结构与抗性水平的关系类似于 CYP6D1 介导的 LPR 品系家蝇的抗性 (Forrester *et al.*, 1993)。但随后的离体代谢研究表明抗性品系棉铃虫的加单氧酶介导的顺式氯戊菊酯或氯菊酯代谢与敏感品系比并无增加 (Gunning *et al.*, 1995; Kennaugh *et al.*, 1993)。

用血红素结合区附近的保守氨基酸残基设计简并引物筛选 cDNA 文库获得了棉铃虫 P450 基因 CYP6B2 (Wang and Hobbs, 1995)。用包含 CYP6B2 的克隆比较了不同品系和诱导剂作用下 mRNA 的表达 (Ranasinghe *et al.*, 1997; Wang and Hobbs, 1995), 表明 CYP6B2 可能参与拟除虫菊酯的代谢。以后进一步研究发现, 敏感与抗性品系棉铃虫 CYP6B2 的表达水平很低 (Pittendrigh *et al.*, 1997; Ranasinghe and Hobbs, 1998), 推翻了以上看法。

最近从棉铃虫中克隆了另外两个 P450 基因 CYP6B6 和 6B7, 其中 CYP6B6 与 CYP6B2 十分相似。且 CYP6B2、CYP6B6 和 CYP6B7 三个 P450 相似性都很高, 以至用 cDNA 探针无法区分它们 (Ranasinghe and Hobbs, 1998)。Northern 印迹分析显示, 与敏感昆虫相比 3 个抗性昆虫中有两个其 CYP6B7 mRNA 水平较高。但考虑到无“加单氧酶介导解毒增加”的证据以及所用品系抗性机制的不确定性, Scott (1999) 认为 Ranasinghe and Hobbs (1998) 提出的“CYP6B7 是棉铃虫拟除虫菊酯代谢的 P450”的结论还为时过早。

用简并引物和 RT-PCR 方法, 8 个新 P450 的部分序列已被克隆 (Pittendrigh *et al.*, 1997), 其中 CYP4G8 mRNA 在抗性品系棉铃虫表达是敏感品系棉铃虫的 2 倍, 其他 P450 片段要么不可检测, 要么各品系间含量相似 (Pittendrigh *et al.*, 1997)。是否这 8 个

P450 在杀虫剂抗性中起作用还不得而知。

#### (5) 蚊虫(mosquito)

最近,加单氧酶证明是五带淡色库蚊(*Culex quinquefasciatus*) (Jpal-per 品系)对拟除虫菊酯杀虫剂抗性的主要机制(Kasai *et al.*, 1998b)。Jpalper 品系库蚊是经氯菊酯选择,表现出对氯菊酯 2500 倍的抗性,这种抗性倍数可因 PBO 降低至 43 倍。与敏感品系相比 Jpal-per 品系库蚊总 P450 和 b5 含量是敏感品系的 2.5 倍。离体代谢(幼虫微粒体)表明,中肠和其他身体部分对氯菊酯的代谢,Jpal-per 品系分别是敏感品系的 5 倍和 20 倍(Kasai *et al.*, 1998b)。

用 RT-PCR,根据已知 CYP6 序列设计引物,从五带淡色库蚊中分离了一个新 P450, CYP6E1 (Kasai *et al.*, 1998a) 以及 6 个其他新序列。PCR 分析显示,Jpal-per 品系与敏感品系相比,CYP6E1 的表达相似,预示 P450 的超量表达可能不是该品系抗性的机制(Kasai *et al.*, 1998a)。

Kasai 等(2000)又从五带淡色库蚊肠中克隆了另一 P450 基因 CYP6F1。Northern 分析表明 CYP6F1 在氯菊酯抗性品系中表达比敏感品系高。其推定的氨基酸序列具有膜锚定信号、还原酶结合位点、血红素结合位点以及底物识别位点。种系发生分析表明, CYP6F1 与 CYP6D1 关系很近,后者已知参与拟除虫菊酯的解毒,但现在无直接证据表明 CYP6F1 与拟除虫菊酯的抗性有关。

#### (6) P450 介导抗性的机制

从以上分析可以看到,至今只有一个 P450 清楚地证明了在抗性中起作用,但许多重要的发现可以从 P450 和杀虫剂抗性研究结果中总结出。

现在已经知道,P450 转录增强可以增加 P450 蛋白的表达和加强对杀虫剂的解毒作用(Liu and Scott, 1998),转录过程受顺式和反式调控(Liu and Scott, 1998)。杀虫剂抗性基因可能在基因组中作图不同于参与杀虫剂代谢的 P450 的基因位点。负责 P450 反式调控的因子也可能调控其他 P450(可能不涉及抗性)的表达。由此可见不仅 P450 底物特异性是变化的,P450 的调控也是变化的。揭示同一因子调控那些 P450 的表达,有助于了解昆虫交叉抗性问题。

抗性的产生可能通过一个 P450 的解毒(如 CYP6D1),因此选择某 P450 的特异性抑制剂可能有效地消除抗性。P450 进攻的部位可能限于杀虫剂的单一部位(Zhang and Scott, 1994),因此换用其他结构的杀虫剂可有效地杀死害虫。某些杀虫剂内 P450 介导解毒作用需要细胞色素 b<sub>5</sub>(Dunkov *et al.*, 1997; Zhang and Scott, 1996),这为抗性的治理提供了另一作用靶标。

不同于酯酶介导的抗性,P450 超量表达不是基因扩增的结果。不能排除在抗性品系中不超量表达的 P450 与抗性有关,因为 P450 氨基酸残基的改变可能导致抗性。丽蝇对有机磷杀虫剂的抗性,已被证明是编码羧酸酯酶的基因的一个氨基酸改变的结果(Newcomb *et al.*, 1997)。在敏感品系中该酶代谢  $\alpha$ -乙酸萘酯而不是有机磷杀虫剂,抗性品系含该酶的突变体,它不再代谢  $\alpha$ -乙酸萘酯,但有效地代谢有机磷杀虫剂(Newcomb *et al.*, 1997)。加单氧酶介导的杀虫剂代谢也可能存在这种机制,现在已知仅一个氨基酸变化就可以彻底改变一个 P450 的底物特异性(Lindberg and Negeski, 1989)。因此,仅根据超量表达这一现象来决定某一 P450 是否与抗性有关是不正确的。

根据已有的研究结果, P450 加单氧酶介导昆虫抗性的可能机制包括:

1) P450 的超量表达与杀虫剂抗性 许多研究结果表明, P450 相关的抗性昆虫往往表现出某种 P450 的超量表达, 感性家蝇 P450 6D1 (P450lpr) 只占总 P450 的 7%, 而对拟除虫菊酯抗性的家蝇, 这一 P450 的含量上升为总含量的 67% (Wheelock and Scott, 1990)。异源表达的 CYP6A1, CYP6D1, CYP6A2, CYP12A1 具有对杀虫剂代谢的活性, 直接证明了这些 P450 的超量表达在杀虫剂抗性形成中起作用 (Berge, 1998)。

关于 P450 超量表达的遗传基础目前了解得还不够全面, 调控基因的变异被认为是 P450 超量表达的主要原因。有机磷杀虫剂抗性的家蝇, 其抗性与 2 号染色体相关, 而 CYP6A1 则位于 5 号染色体; 与家蝇拟除虫菊酯抗性相关的 CYP6D1 基因位于 1 号染色体, 而其表达则受位于 2 号染色体的因子调控。这些事实说明, 抗性昆虫 P450 的超量表达很可能是反式遗传因子作用的结果 (Berge *et al.*, 1998)。这一因子的突变使在感性昆虫中低表达的 P450, 在抗性昆虫中表现为超量表达 (Berge *et al.*, 1998)。对果蝇的 CYP6A2 (Berge *et al.*, 1998), CYP6E2 (Berge *et al.*, 1998), CYP6A9 (Maitra *et al.*, 1996) 基因, 棉铃虫的 CYP6B7 (Ranasinghe *et al.*, 1998) 的研究结果表明, 它们的超量表达也受反式因子的调控。

LPR 品系家蝇对拟除虫菊酯的抗性证明是 CYP6D1 超量表达的结果, 通过对其抗性的遗传分析表明, 这种抗性是多基因的, CYP6D1 超量表达同时受位于 1 号染色体上的完全显性因子(顺式)和 2 号染色体的不完全显性(反式)的控制 (Liu and Scott, 1996)。

用 20-羟基蜕皮酮(20HE)处理 Oregon 品系果蝇, 其抗性相关的细胞色素 P450B 含量以及酶系的活性提高, 当抑制蜕皮酮的合成时 CYP6A2 mRNA 含量降低。这一现象表明, 20HE 对细胞色素 P450 CYP6A2 的超量表达及其介导的抗性具有调控作用 (Spiegelman *et al.*, 1997)。

2) 氨基酸替换与杀虫剂抗性 在某些 PBO 增效的抗性品系家蝇中并未发现 CYP6A1 mRNA 的超量表达, 推测 P450 介导的抗性可能还存在其他抗性机制。通过比较果蝇的不同抗性水平的 3 个品系的 CYP6B2 序列, 发现存在 3 个氨基酸替换 (R355S, L336V, V476L), 推测这 3 个氨基酸突变可能影响 CYP6A2 活性中心位点。异源表达 (*E. coli*) 实验证明, 这些突变虽未改变 CYP6A2 对睾丸激素的活性, 却增强了对 7-乙氧香豆素 (ethoxycoumarin), 7-苯酰氧基香豆素 (benzoyloxycoumarin), 特别是对 DDT 的代谢活性, 认为氨基酸替换也可能与昆虫 P450 介导的抗药性有关 (Berge *et al.*, 1998)。

3) P450 的超量表达和氨基酸替换联合作用 P450 的超量表达对家蝇和果蝇抗药性的形成具有重要作用, 而果蝇的抗药性有可能是 CYP6A2 的超量表达和氨基酸替换联合作用的结果, 即抗性昆虫超量表达了对杀虫剂具有较高催化效应的 CYP6A2 等位基因。

有研究表明, P450 的超量表达可能降低昆虫的适合度, 因为超量表达的 P450 可能同时具有对内源性的激素分子的功能。而氨基酸替换可能对昆虫的适合度影响较小, 因此导致抗性的氨基酸替换一旦在种群中固定下来, 将可能促进超量表达机制的丧失 (Berge *et al.*, 1998)。

### 8.3.2 昆虫 P450 的生理功能

人们对昆虫P450酶系的作用侧重于它在外源物质代谢中的代谢解毒,近20年来,研究发现P450酶系在许多内源性的生理物质的代谢中起重要作用。

#### 8.3.2.1 保幼激素(juvenile hormone, JH)及其类似物的代谢

### (1) 保幼激素的代谢

保幼激素在化学上是衍于倍半萜烯碳链的环氧酸甲基酯(epoxy acid methyl ester),其合成和释放部位为昆虫的咽侧体。它们在昆虫从胚胎到成虫的发育过程中起着重要作用。JH合成受阻,昆虫表现为幼虫期过早地变态和成虫期的不育。

JH-Ⅲ (甲基-10,11-环氧-3,7,11-三甲基-反,反-2,6-十二碳二烯酯)合成的最后一个酶,称为甲基法呢酸酯环氧化酶(methyl farnesoate epoxidase),该酶的P450本质在蜚蠊(*Blaberus giganteus*)和飞蝗(*Locusta migratoria*)中得到证实(Hammock, 1975; Feyereisen *et al.*, 1981)。Hammock(1975)报道了*B. giganteus* 甲基法呢酸酯环氧化成保幼激素Ⅲ(JHⅢ)的作用受咽侧体匀浆液中类似P450的酶催化的,随后在飞蝗的研究中证明甲基法呢酸酯立体选择性的环氧化作用受咽侧体微粒体P450催化(Feyereisen *et al.*, 1981)。

家蝇 JH-I (E,E-cis-甲基-10,11-环氧-7-己-3,7-二甲基-2,6-十三碳二烯酸酯) 环氧化成其二环氧化物 (Hammock and Quistad, 1981) 作用部位是 JH-I 的 6-7 双键, 这一活性依赖于 NADPH, 可被 CO 和增效醚抑制, 受苯巴比妥诱导, 且杀虫剂抗性家蝇比感性家蝇活性高。这些特征证明 P450 参与了这一环氧化过程 (Pratt *et al.*, 1990)。一个类似的作用在果蝇中也发现 (Ajami and Riddiford, 1973)。用重组的大鼠肝 P450 酶系离体实验进一步证实了细胞色素 P450 参与了 JH-I 的代谢 (Agosin *et al.*, 1979; Morella *et al.*, 1980)。

近期的研究发现了一种新的P450即CYP4C1,该基因在大肠杆菌表达后经纯化和活性重组,可以转化为包括从法呢醇(farnesol)到JH-Ⅲ在内的倍半萜烯类似物(sesquiterpenoids)各自的12-(反式)-羟基化中间体(Sutherland,1998)。这一代谢过程的生理功能

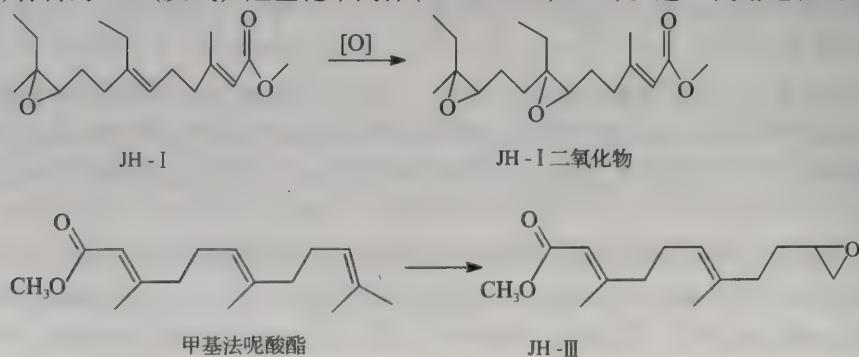


图 8.7 保幼激素的代谢

还不清楚,但从它的时序表达规律预示它与 JH 滴度的迅速下降有关(清除 JH 的可能前体),或者它的表达标志着咽侧体的功能已转变成产生一个新的未知功能的羟基- JH 相关的分子。从飞蝗咽侧体中检测出 12-(顺式)-羟基- JH-Ⅲ (Darrouzet *et al.*, 1997), 表明有类似功能的 P450 可能在许多昆虫中存在。

P450 酶系在 JH 相关化合物代谢中的作用也受到关注,纯化的 P450 CYP6A1 重组实验证明,该酶具有催化多种萜类代谢的功能,它甚至可以使甲基法呢酸酯变成其双环氧化物(Andersen *et al.*, 1997),而后者是环氧化物水解酶的底物,由此再进入其他物质代谢途径。

从生殖活跃时期的太平洋摺翅蠊(*Diploptera punctata*)的咽侧体(CA)cDNA 文库中分离出编码细胞色素 P450 的 cDNA,定名为 CYP4C7。CYP4C7 选择性地在咽侧体中表达,其 mRNA 不存在脂肪体或脑中,在中肠、盲囊(caeca)中适量表达。CYP4C7 mRNA 在咽侧体中的表达是在 JH 合成高峰后迅速增加,至第 7 天达最高(产卵前)。产卵后和生殖期间降低。用大肠杆菌表达的 CYP4C7 蛋白与家蝇 NADPH 细胞色素 P450 还原酶,细胞色素 b<sub>5</sub> 以及 NADPH 构成的重组体系中,可以将(2E,6E)-法呢醇羟基化为(10E)-12-羟基法呢醇。CYP4C7 将 JHⅢ转化成 1 $\alpha$ -反式-羟基 JH-Ⅲ,对其他类似的倍半萜也有代谢作用。倍半萜的  $\alpha$ -羟基化作用可能在生殖滋养周期终结时抑制 JH 合成中起作用。CYP4C7 与 *Blaberus discoidalis* CYP4C1 有 44.3% 相同,与果蝇 *D. melanogaster* CYP4D1 34.9%,与 *Manduca sexta* CYP4M2 有 34.9% 相同。(Sutherland *et al.*, 1998)。

### (2) JH 类似物的代谢

JH 类似物的烷基 3,7,11-三甲基-2,4-十二碳二烯酸酯(dodecadienoate)类化合物可以被家蝇、丽蝇(*Phormia regina*)和麻蝇 *Sarcophaga bullata* 微粒体氧化(Yu and Terriere, 1975a, 1975b, 1977a, 1977b, 1977c)。支链烷基类似物(包括控虫素)的产物尚未得到鉴定,但无支链类型(包括增丝素)的氧化产物是 2,3 或 4,5 双键的环氧化物。这种酶活性在抗性品系昆虫中较高,且可被苯巴比妥诱导。由酯酶作用形成的酸可代谢为环氧化物(Yu and Terriere, 1977a)(图 8.8)。Hammock 等(1977)证明家蝇幼虫和成虫中控虫素经 P450 氧化酶代谢的主要产物是 O-脱烷基作用形成的羟基酯(hydroxy ester)。

### (3) 抗-JHs 物质的代谢

从鳄耳草(*Ageratum houstonianum*)中提取的两种活性成分,可以使敏感昆虫过早蜕皮,它们是 7-甲氧-2,2-二甲基色烯和 6,7-二甲氧-2,2-二甲基色烯,称为早熟素 I 和早熟素 II (Bowers, 1981),它们抑制咽侧体的发育或者使这些腺体过量坏死而破坏 JH 的产生。经早熟素处理的敏感昆虫,其 JH 水平下降,导致幼虫过早变态以及卵巢功能的消失。

在几种昆虫中发现早熟素-II 的中间物(3,4-二氢二醇),提示早熟素的生理作用可能是通过这中间体的环氧化物进行的。早熟素的这种环氧化物作用是由微粒体 P450 催化完成(Ellis-Pratt, 1983)。早熟素经环氧化作用形成早熟素 3,4-环氧化物将使细胞大分子产生烷基化作用,从而损伤某些敏感昆虫的咽侧体(Feyereisen *et al.*, 1981; Ellis-Pratt, 1983)。通常认为早熟素是咽侧体环氧化酶(具有 JH 合成功能)的底物,但还需更多的证据。

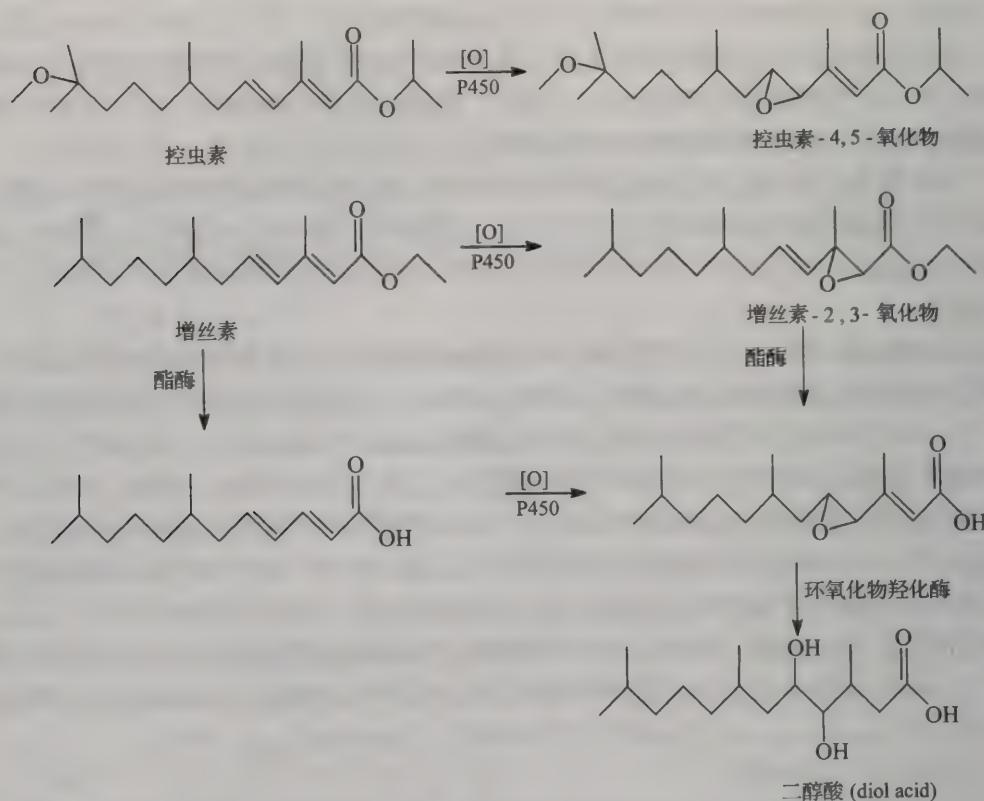
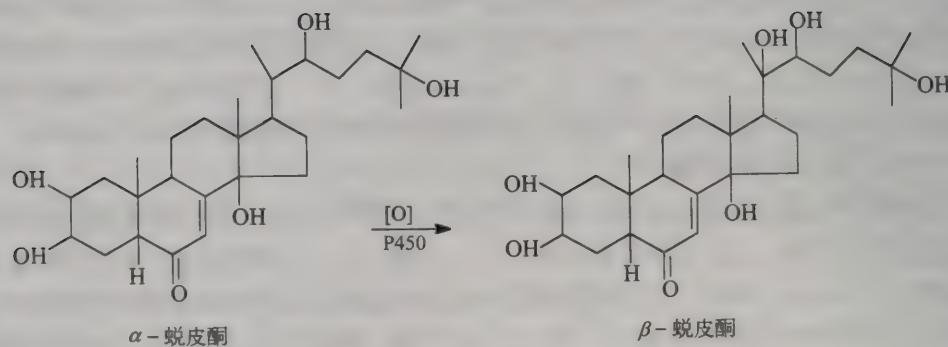


图 8.8 JH 类似物的代谢

图 8.9  $\alpha$ -蜕皮酮的羟基化

### 8.3.2.2 蜕皮甾醇的代谢

蜕皮甾醇(ecdysteroids)是多羟基化的酮式甾醇(ketosteroids),在调节昆虫发育和变态中发挥着重要的作用。在昆虫中检测出的甾醇种类很多,其中研究得最多的是蜕皮酮(ecdysone,  $\alpha$ -蜕皮酮)和 20-羟基蜕皮酮( $\beta$ -蜕皮酮, 20-hydroxyecdysone)。昆虫的前

胸腺分泌蜕皮酮,但这种甾醇并非昆虫幼虫主要的蜕皮激素,而是蜕皮激素 20-羟基蜕皮酮的前体。

### (1) 蜕皮酮前体的生物合成

从胆固醇到蜕皮酮的合成是由多步酶促过程催化的,在前胸腺和卵巢的卵泡细胞,由胆固醇→7-脱氢胆固醇(7-dehydrocholesterol)是蜕皮甾醇生物合成的第一步(Ress, 1995),已知几种 P450 具有催化烃化合物的去饱和作用而不形成羟基化中间体的功能,因此推断 P450 可能在 7-脱氢胆固醇合成中起作用。飞蝗幼虫前胸腺和雌成虫卵巢的卵泡细胞有细胞色素 P450 在 C<sub>25</sub>、C<sub>22</sub>、C<sub>2</sub> 羟基化中起作用已得到充分证实(Kappler et al., 1986; Kappler et al., 1988)。下表列出了参与蜕皮甾醇羟基化的 P450 性质。

表 8.5 参与蜕皮甾醇生物合成的细胞色素 P450

羟基化位置	组织	亚细胞分级	K <sub>m</sub>
C <sub>20</sub>	脂肪体、中肠、马氏管、器官芽	微粒体、线粒体	0.27 μm
C <sub>2</sub>	前胸腺、卵泡细胞、马氏管、脂肪体、中肠	线粒体	0.4 μm
C <sub>22</sub>	前胸腺	线粒体	1.5 μm
C <sub>25</sub>	前胸腺	线粒体	2.5 μm

由胆固醇到 C<sub>25</sub> 羟基化酶底物(2,22,25-三脱氧蜕皮酮)的形成,也有可能由 P450 催化,但至今尚未开展其酶学方面的研究。

### (2) 蜕皮激素的生物合成与蜕皮酮 20-加单氧化酶

20-羟基蜕皮酮是 α-蜕皮酮经酶催化的产物,首先来自 Nigg 等(1974)的报道,这一作用是依赖于 NADPH 由线粒体酶催化的(Nigg et al., 1976)。在埃及噬菌体(*Schistocerca gregaria*)中发现一类似的酶(Johnson and Rees, 1977),通过标志酶研究,该酶活性存在于 10kg 细胞分级(主要成分为线粒体),在微粒体中也可检测出活性,但其比活力比线粒体低得多。该酶活性依赖于 NADPH 和分子氧,可被 CO 抑制,这些事实积极地支持了 P450 α-蜕皮酮向 β-蜕皮酮转化过程中的作用。随后通过 CO 抑制作用的光逆转变现象以及 P450 抑制剂甲吡酮(metyrapone)的抑制作用,进一步证明了 P450 催化 α-蜕皮酮向 β-蜕皮酮的转化。Gilbert 及其同事以烟草芽天蛾(*Manduca sexta*)的研究充分证明了线粒体细胞色素 P450 系统参与 α-蜕皮酮向 β-蜕皮酮的转化(Hodgson, 1985)。

使 α-蜕皮酮转化为具活性的 β-蜕皮酮的 P450 酶系为蜕皮酮 20-加单氧化酶,该酶是目前研究得最为深入的一种酶。该酶在多种昆虫中发现,分布在昆虫的不同组织,主要在脂肪体、中肠、马氏管,而在分泌蜕皮酮的前胸腺中尚未发现。有趣的是,该酶存在双定位现象,可以分别定位在微粒体或线粒体中,也可以同时存在于这两亚细胞分级中,随种类、组织和实验条件的不同,其中一种可能占优势。如飞蝗的马氏管(Feyereisen and Durst, 1978),太平洋摺翅蠊(*Diploptera punctata*)中肠(Halliday et al., 1986),大菜粉蝶(*Pieris brassicae*)的器官芽(imaginal disk)(Blais and Lafont, 1986),微粒体酶占优势;而沙漠蝗(*Schistocerca gregaria*)马氏管(Greenwood and Rees, 1984),烟草天蛾(Smith et al., 1979),棉贪夜蛾(*Spodoptera littoralis*)脂肪体,线粒体酶占优势;烟草天蛾的中肠,2 个细胞分级都有很高的活性(Weirich et al., 1985)。因此,有人提出同种昆虫可能不止一个基因编码具有这一催化活性的 P450。微粒体酶和线粒体酶这两个酶系统对蜕皮酮的 K<sub>m</sub>

值同一数量级,但其他生物化学特征不同,这就难以确定哪一酶系统起主导作用。

P450 酶系这种双定位现象是不寻常的,因为从哺乳动物中的研究结果我们已知线粒体与微粒体 P450 具有不同的电子传递途径(分别由皮质铁氧还蛋白还原酶/皮质铁氧还蛋白与 NADPH 细胞色素 P450 还原酶)。因此鉴定线粒体酶和微粒体的酶系统的电子传递途径显得十分必要。由 NADPH-细胞色素 P450 还原酶制备的抗体可以降低太平洋摺翅蠊中的微粒体蜕皮酮 20-加单氧酶的活性(Halliday *et al.*, 1986),但在线粒体酶没有类似的实验证据。在烟草天蛾脂肪体、线粒体中发现存在铁氧还(ferredoxin)类型的铁硫蛋白,但未知其性质和功能(Smith *et al.*, 1979)。Srivatsan 等(1990)从家蝇幼虫线粒体分级中纯化了 6 种细胞色素 P450,它们与猪肾上腺皮质铁氧还蛋白及铁氧还蛋白还原酶的重组体系可以催化蜕皮酮的 20-羟基化。

### (3) 蜕皮激素的进一步羟基化

20-羟基蜕皮酮因 C<sub>26</sub> 的进一步羟基化形成 26-蜕皮酸而失活(Lafont *et al.*, 1983),起始步骤 C<sub>26</sub> 羟基化作用是由微粒体 P450 催化的(Kayser, 1997)。随后继续氧化变成醛和羧酸,这可能还是多功能的 P450 进一步氧化作用的结果。此外,其他种类的 P450 也可能参与这些反应。有实验表明 C<sub>26</sub> 羟基化酶可被蜕皮酮和非甾醇兴奋剂(nonsteroidal agonist) RH-5849 所诱导(Williams *et al.*, 1997),而可诱导性是 P450 的一个特征,这进一步支持 C<sub>26</sub> 羟基化酶是 P450 的推断。

从果蝇(*Drosophila acanthoptera*)分离的 P450 基因 CYP12B1 具有与脊椎动物线粒体 P450 高度的区域(regional)同源性,种系发生分析表明 CYP12B1 与哺乳动物线粒体 P450(CYP24 家族)亲缘关系最近,CYP24 被认为通过代谢维生素 D<sub>3</sub> 在钙的体内稳态过程中发挥重要的作用。从同源 P450 功能是保守的这一思路出发,根据黄粉虫(*Tenebrio molitor*)钙结合蛋白及其调控的现有认识,推测 CYP12B1 的作用是通过 20-羟基蜕皮酮的形成或降解来调节钙的体内稳态,这一假设还需证实(Danielson and Fogelman, 1997)。

### 8.3.3 脂肪酸代谢

脂肪酸(如月桂酸)的  $\omega$ -羟基化作用已在几种昆虫中如飞蝗(Feyereisen and Durst, 1980),家蝇(Ronis *et al.*, 1988; Clarke *et al.*, 1989)和果蝇(Cuany *et al.*, 1990)中发现,羟基化部位发生在 C<sub>12</sub> 和 C<sub>11</sub>。家蝇 C<sub>12</sub> 的羟基化可被安妥明诱导 5 倍,家蝇微粒体与大鼠 P450 CYP4A1(具月桂酸羟基化作用)的抗体间不存在免疫交叉反应(Clark *et al.*, 1989)。从太平洋摺翅蠊脂肪体获得了 CYP4C1 cDNA(Bradfield 等, 1991),该基因的表达可因饥饿和在去头昆虫中注入 hypertrehalosemic 激素而大量诱导。通过类比脊椎动物 CYP4 家族 P450 的功能, Keeley 等(1994)提出 CYP4C1 可能催化脂肪酸  $\omega$ -羟基化作用,并有可能参与酮体的形成。哺乳动物中类花生四烯酸的代谢,在昆虫中尚未发现。

### 8.3.4 碳氢化合物的生物合成

昆虫表皮含大量的碳氢化合物, Reed 等(1994)有关家蝇的研究为碳氢化合物的生物合成提供了重要的线索。长碳链(18-28 碳)酰基辅酶 A 酯转化为烃,经历两个步骤,

首先是酰基辅酶 A(acyl-CoA)还原为醛,随后是酰基链脱去一个碳的脱羧基作用。在家蝇表皮微粒体,第二步反应依赖于分子氧和 NADPH,并且被 CO 以及家蝇 NADPH 细胞色素 P450 还原酶的抗体所抑制(Reed *et al.*, 1994)。在反应过程中,末端羧基以  $\text{CO}_2$  形式出现,并未检测出去饱和中间体,为此推测出这一氧化脱羧反应是由具有独特性质的 P450( $\text{P450}_{\text{hyd}}$ )催化完成(Reed *et al.*, 1994; Reed *et al.*, 1995)。

### 8.3.5 信息激素的代谢

从许多信息素的结构就使人们想到 P450 可能在其生物合成(环氧化物、醇等)或分解代谢中(去饱和)起作用(Brattsten, 1979; Hunt and Smirle, 1988; Fang *et al.*, 1995; White *et al.*, 1979),如午毒蛾(*Lymantria dispar*)信息素(disparlure)和黑钻孔小蠹(*Dendroctonus terebrans*)信息素以及其他一些昆虫的信息素及防御化合物所具有的结构显示,P450 在从起始合成或由食物中植物次生物质的中间物合成这些物质中起作用。

雌性家蝇性信息素的主要成分是(Z)-9-廿三碳烯,它是 P450 hyd 催化作用的产物。而(Z)-9-廿三碳烯的进一步代谢由表皮微粒体的一个更典型的 P450 酶所催化,产物是(z)-9,10-环氧廿三碳烷和(Z)-14-廿三碳-10-酮(Ahmad *et al.*, 1987)。该酶进攻链内距末端第 9 个碳原子,产物可能是双键的环氧化或是甲叉基的羟基化。经羟基化的产物(醇)可以进一步生成酮(Ahmad *et al.*, 1987)。该酶在表皮和脂肪体存在,但其最高活力表达在雄性触角(antennae)(Ahmad *et al.*, 1987),显示该特异性酶参与信息素的分解代谢。

在信息素代谢中起作用的 P450 中的许多种类具有高度的特异性,如黑钻孔小蠹信息素(类萜信息素)是由食物中的  $\alpha$ -蒎烯(pinene)产生,其中  $\alpha$ -蒎烯  $\rightarrow$   $\alpha$ -蒎烯氧化物的转化是激素产生的起始步骤,由该虫的微粒体酶催化。该微粒体制备液表现出对  $\alpha$ -蒎烯非常高的特异性[5.07 nmol/(产物  $\cdot$  nmol P450  $\cdot$  min)]。与之对比,大鼠肝微粒体未经诱导该值仅为 0.07,经  $\alpha$ -蒎烯诱导的大鼠肝微粒体也只有 0.12(White *et al.*, 1979)。可预见,对该类 P450 选择抑制剂的设计将有较好的应用前景(Feyereisen, 1999)。

分异发丽金龟(*Phyllopertha diversa*)利用一种特殊的生物碱 1,3-二甲基-2,4-(1H,3H)-喹唑啉二酮[1,3-dimethyl-2,4-(1H,3H)-quinazolinedione],作为它的性信息素,这个咖啡因类型的化合物可被该虫触角蛋白降解。主要的分解途径为 N-1 位置上的去甲基化作用和芳香环的羟基化作用(图 8.10)。起作用的酶与膜结合,需 NADPH,

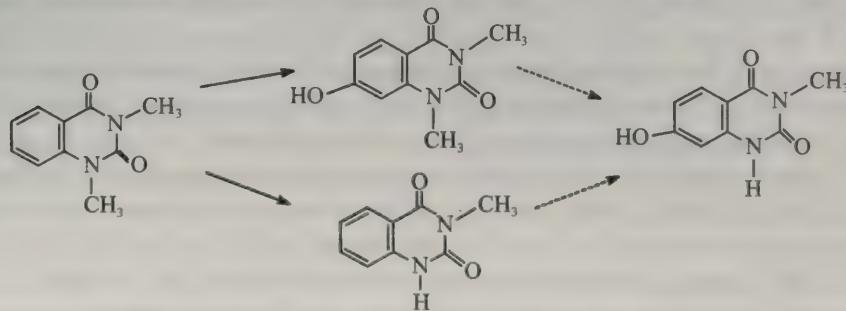


图 8.10 分异发丽金龟(*Phyllopertha diversa*)性信息素的降解

且对 P450 的抑制剂(如 proadifen 及甲吡酮)敏感,被认为是 P450。比较 12 种昆虫,包括亲缘关系很近的金龟子以及一些模型鳞翅目昆虫,发现除在日本弧丽金龟(*Popillia japonica*)有相似的酶活性外,其他昆虫均未检测到这种活性。说明该酶系统特异性地在雄性金龟子触角中表达,作为嗅觉信号降解的机制。

用结构类似的化合物——咖啡因测定发现,该金龟子触角酶系统可以降解咖啡因,主要形成茶碱,但其速率比信息素低 1 个数量级。表明该酶系统具有较强的底物特异性。

在黄猩猩果蝇的触角中检测出活性高的 NADPH-细胞色素还原酶,因而推定该昆虫的 P450 酶系在气味清除过程中起作用(Wojtasek and Leal, 1999)。

### 参 考 文 献

邱星辉和冷欣夫. 1999. 昆虫细胞色素 P450 基因的表达与调控及 P450 介导抗性的分子机制,农药学学报 1(1):5~14

Agosin M. 1985. Role of microsomal oxidations in insecticide degradation. In: Kerkut GA, Golgert LI, eds., Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology. Vol. 12 New York: Pergamon, 647~712

Agosin M, Morello A, White R et al. 1979. Multiple forms of noninduced rat liver cytochrome P450. J. Biol. Chem., 254: 9915~9920

Ahmad S, Kirkland K E, Blomquist G J. 1987. Evidence for a sex pheromone metabolizing cytochrome P450 monooxygenase in the housefly. Arch. Insect Biochem. Physiol, 6: 121~140

Ajami A M, Riddiford L M. 1973. Comparative metabolism of the cecropia juvenile hormone. J. Insect. Physiol, 19: 635~645

Amichot M, Brun A, Cuany A et al. 1994. Expression study of CYP genes in *Drosophila* strains resistant or sensitive to insecticides. Cytochrome P450 Cle-chner M C, ed. (8th Int, conf.) Paris: Libbey, 689~692

Andersen J F, Utermohlen J G, Feyereisen R. 1994. Expression of house fly CYP6A1 and NADPH-cytochrome P450 reductase in *Escherichia coli* and reconstitution of an insecticide-metabolizing P450 system. Biochem, 33, 2171~2177

Andersen J F, Walding J K, Evans P H et al. 1997. Substrate specificity for the epoxidation of terpenoids and active site topology of CYP6A1, a house fly cytochrome P450. Chem Res. Toxicol. 10:156~164.

Berenbaum M, Feeny P. 1981. Toxicity of angular furanocoumarins to swallowtail butterflies: Escalatius. In a coevolutionary arms race? Sci., 212: 927~929

Berenbaum M R, Cohen M B, Schuler M A. 1990. Cytochrome P450 in plant-insect Interactions: Inductions and deductions. In: Molecular Insect Science (Hagedorn H H et al. eds). New York: Plenum 257~262.

Berenbaum M R. 1991, Coumarins. In Rosenthal G. A., Berenbaum M. R. ed. Herbivores. Their interactions with secondary plant Metabolites. 2nd edition Vol. 1, SanDiego, California: Acad. Press, 221~249

Berenbaum M R, Favret C, Schuler MA. 1996. On defining key innovations in an adaptive radiation—cytochrome P450s and Papilionidae. Am. Nat., 148: 139~155

Berge J B, Feyereisen R, Amichot M. 1998. Cytochrome P450 monooxygenases and insecticide resistance in insects. Phil. Trans. R. Soc., 353:1071~1075

Blais C, Lafont R. 1986. Ecdysone 20 - hydroxylation in imaginal wing discs of *Pieris brassicae* (Lepidoptera): correlations with ecdysone and 20 - hydroxyecdysone titers in pupae. Arch. Insect Biochem Physiol, 3: 501~512

Bowers W S. 1981. How anti-juvenile hormones work. Amer. Zool., 21: 737~742

Bowers W S, Ohta T, Cleere Js et al. 1976. Discovery of insect anti-juvenile hormones in plants. Science, 193:542~547

Bradfield J Y, Lee Y H, Keeley L L. 1991. Cytochrome P450 family 4 in a cockroach: Molecular cloning and regulation by hypertrehalosemic hormone. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:4558~4562

Brattsten L B. 1979. Ecological significance of mixed-function oxidations. Drug Metab. Rev., 10:35~58

Brattsten L B. 1992. Metabolic defenses against plant allelochemicals. In: Herbivores: their interactions with secondary plant metabolites. 2nd edition, vol. 2, Evolutionary and process. (Rosenthal GA and Janzen D, eds). Academic Press, New

York. PP219~242.

Brattsten L B, Wilkinson CF, Eisner T. 1977. Herbivore-plant interactions: Mixed-function oxidases and secondary plant substances. *Science*, 196: 1349~1352

Bride J M, Cuany A, Amichot M et al. 1997. Cytochrome P450 field insecticide tolerance and development of laboratory resistance in grape vine populations of *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae). *J. Econ. Entomol.*, 90: 1514~1520

Brun A, Cuany A, LeMouel T et al. 1996. Inducibility of the *Drosophila melanogaster* cytochrome P450 gene, CYP6A2, by phenobarbital in insecticide susceptible or resistant strains. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 26:697~703

Bull D L, Ivie G W, Beier R C et al. 1986. *In vitro* metabolism of a linear furanocoumarin (8-methoxysoralen, xanthotoxin) by mixed-function oxidase of larvae of black swallowtail butterfly and fall armyworm. *J. Chem. Ecol.*, 12: 885~892

Carino F, Koener J F, Plapp FW Jr et al. 1992. Expression of the cytochrome P450 gene CYP6A1 in the housefly, *Musca domestica*. In: Mullin CA, Scott JG, (eds.), *Molecular Mechanisms of Insecticide resistance: Diversity Among Insects*, Vol. ACS Symposium series 505. American Chemical Society, Washington, DC, 31~40

Carino F, Koener J F, Plapp F W Jr et al. 1994. Constitutive over-expression of the cytochrome P450 gene CYP6A1 in a house fly strain with metabolic resistance to insecticides. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 24:411~418

Clarke S E, Brealey C J, Gibson G G et al. 1989. Cytochrome P450 in the housefly; Induction, substrate specificity and comparison to three rat hepatic isoenzymes. *Xenobiotica*, 19:1175~1180

Cohen M B, Berenbaum M R, Schuler M A. 1989. Induction of cytochrome P450-mediated detoxification of xanthotoxin in the black swallowtail. *J. Chem. Ecol.*, 15:2347~2355

Cohen M B, Feyereisen R. 1994. A cluster of cytochrome P450 genes of the Cyp6 family in the house fly. *DNA Cell Biol.*, 14:73~82

Cohen M B, Koener J, Feyereisen R. 1994. Structure and chromosomal localization of CYP6A1, a cytochrome P450-encoding gene from the house fly. *Gene*, 146: 267~272

Cohen M B, Schuler M A, Berenbaum M R. 1992. A host-inducible cytochrome P450 from a host-specific caterpillar: molecular cloning and evolution. *Proc. Natl. Sci. USA*, 89:10920~10924

Cuany A, Pralavorio M, Pauron D et al. 1990. Characterization of microsomal oxidative activities in a wild-type and in a DDT resistant strain of *Drosophila melanogaster*. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 37:293~302

Danielson P B, Fogleman J C. 1997. Isolation and sequence analysis of cytochrome P450 12B1: the first mitochondrial insect P450 with homology to 1 alpha, 25-dihydroxy-D3,24-hydroxylase. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 27:595~604

Danielson P B, Macintre R J, Fogleman J C. 1997. Molecular cloning of a family of xenobioticinducible drosophilid cytochrome P450s: evidence for involvement in host-plant allelochemical resistance. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 94: 10797~10802

Dapkus D, Merrell D J. 1977. Chromosomal analysis of DDT-resistance in a long-term selected population of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 87:685~697

Darrouzet E, Mauchamp B, Prestwich G D et al. 1997. Hydroxy juvenile hormones new putative juvenile hormones biosynthesized by locust corpora allata *in vitro*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 240:752~758

Delpuech J Aquadro C F, Roush R T. 1993. Noninvolvement of the long terminal repeat of transposable element 17.6 in insecticide resistance in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:5643~5647

Dombrowski S M, Krishnan R, Witte M et al. 1998. Constitutive and barbitol-induced expression of the Cyp6a2 allele of a high producer strain of Cyp6a2 in the genetic background of a low producer strain. *Gene*, 211:69~77

Dong K, Valles S M, Scharf M E et al. 1998. The Knockdown resistance (kdr) mutation in pyrethroid-resistant German cockroaches. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 60:195~204

Dunkov B C, Guzov V M, Mocelin G et al. 1997. The *Drosophila* cytochrome P450 gene Cyp6a2: structure, localization, heterologous expression and induction by phenobarbital. *DNA Cell Biol.*, 16:1345~1356

Dunkov B C, Rodriguez-Arnaiz R, Pittendrigh B et al. 1996. Cytochrome P450 gene clusters in *Drosophila melanogaster*.

Mol. Genet., 251:290~297

Eldefrawi M E, Miskus R, Sutcher V. 1960. Methylenedioxyphenyl derivatives as synergists for carbamate insecticides on susceptible, DDT- and parathion-resistant house flies. J. Econ. Entomol., 53:231~234.

Ellis-Part G. 1983. The mode of action of pro-allatocidins. In *Natural Products for Innovative Pest Management* D Whitehead, W S Bowers. ed. PP223~255. Oxford, UK: Pergamon.

Estabrook R W. 1996. The remarkable P450s: a historical overview of these versatile hemeprotein catalysts. FASEB J., 10:202~204

Fang N, Teal PEA, Tumlinson J H. 1995. Characterization of oxidases associated with the sex pheromone gland in *Manduca sexta* (L.) females. Arch. Insect Biochem. Physiol., 29:243~257

Feyereisen R. 1983. Polysubstrate monooxygenases (cytochrome P450) in larvae of susceptible and resistant strains of house flies. Pestic. Biochem. Physiol., 19:262~269

Feyereisen R, Durst F. 1978. Ecdysterone biosynthesis: a microsomal cytochrome P450-linked ecdysone 20-monooxygenase from tissues of the African migratory locust. Eur. J. Biochem., 88:37~47

Feyereisen R. 1999. Insect P450 enzymes. Annu. Rev. Entomol., 44:507~533

Feyereisen R, Andersen JF, Carino FA et al. 1995. Cytochrome P450 in the housefly: Structure, catalytic activity and regulation of expression of *Cyp6A1* in an insecticide-resistant strain. Pestic. Sci., 43:233~239

Feyereisen R and Durst F. 1978. Ecdysterone biosynthesis: a microsomal cytochrome P450-linked ecdysone 20-monooxygenase from tissues of the African migratory locust. Eur. J. Biochem., 88:37~47

Feyereisen R, Durst F. 1980. Development of microsomal cytochrome P450 monooxygenases during the last larval instar of the locust, *Locusta migratoria*: Correlation with the hemolymph 20-hydroxyecdysone titer. Mol. Cell. Endocrinol., 20: 157~169

Feyereisen R, Johnson G, Koener J et al. 1981. Precocenes as proallatocidins in adult female *Diptoptera punctata*: A functional and ultrastructural study. J. Insect Physiol., 27:855~868

Feyereisen R, Koener J F, Farnsworth D E et al. 1989. Isolation and sequence of cDNA encoding a cytochrome P450 from an insecticide-resistant strain of the housefly, *Musca domestica*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:1465~1469

Feyereisen R, Pratt G F, Hamnett A F. 1981. Enzymic synthesis of juvenile hormone in locust corpora allata: Evidence for a microsomal cytochrome P450 linked methyl farnesoate epoxidase. Eur. J. Biochem., 118:231~238

Ffrench-Constant R H, Steichen J C, Rocheleau T A et al. 1993. A single-amino acid substitution in a gamma-aminobutyric acid subtype A receptor locus is associated with cyclodiene insecticide resistance in *Drosophila* populations. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:1957~1961

Fogleman J C, Danielson P B, MacIntyre R J. 1997. The molecular basis of adaptation in *Drosophila*: the role of cytochrome P450s. Evol. Biol., 30:15~77

Forrester N W, Cahill M, Bird L J et al. 1993. Management of pyrethroid and endosulfan resistance in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Australia. Bull. Entomol. Res. Suppl. Ser., 1:1~132

Frank M R, Fogleman J C. 1992. Involvement of cytochrome P450 in host-plant utilization by Sonoran Desert *Drosophila*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:11998~12002

Frolov M V, Alatortsev V E. 1994. Cluster of cytochrome P450 genes on the X chromosome of *Drosophila melanogaster*. DNA Cell Biol., 13:663~668

Fuchs S Y, Spiegelman V S, Belitsky G A et al. 1994. Inducibility of various cytochrome P450 isoenzymes by phenobarbital and some other xenobiotics in *Drosophila melanogaster*. Biochem. Pharmacol., 47:1867~1873

Fuchs S Y, Spiegelman V S, Belitsky G A et al. 1993. The effect of the cytochrome P450 system inducers on the development of *Drosophila melanogaster*. J. Biochem. Toxicol., 8:83~87

Gandhi R, Varak E, Goldberg ML. 1992. Molecular analysis of a cytochrome P450 gene of family 4 on the *Drosophila* X chromosome. DNA Cell Biol., 11:397~404

Gilbert W. 1987. The exon theory of genes. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 52:901~905.

Gotoh O, Fujii-Kurijama Y. 1989. Evolution, structure and gene regulation of cytochrome P450. In: Ruckpaul, K, Rein

H, (eds.), *Frontiers in Biotransformation*. vol. 1. New York: Taylor and Francis, 195~243

Gould F. 1984. Mixed function oxidases and herbivore polyphagy: The devil's advocate position. *Ecol. Entomol.*, 9:29~34

Greenwood D R, Rees H H. 1984. Ecdysone 20-mono-oxygenase in the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *Biochem J.* 223(3):837~847.

Gunning R V, Devonshire A L, Moores G D. 1995. Metabolism of esfenvalerate in pyrethroid susceptible and -resistant Australian *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Pestic. Biochem. Physiol.*, 51:205~213

Guzov V M, Houston H L, Murataliev M B et al. 1996. Molecular cloning overexpression in *Escherichia coli*, structure and functional characterization of house fly cytochrome b<sub>5</sub>. *J. Biol. Chem.*, 271:1~9

Guzov V, Unnithan G C, Chernogolov A A, Feyereisen R. 1998. CYP12A1, a mitochondrial P450 from the house fly. *Arch. Biochem. Biophys.*, 359:231~240

Halliday W R, Farnsworth D E, Feyereisen R. 1986. Hemolymph ecdysteroid titer and midgut ecdysone 20-monoxygenase activity during the last larval stage of *Diploptera punctata*. *Insect Biochem.*, 16:627~634

Hammock B D. 1975. NADPH dependant epoxidation of methyl farnesoate to juvenile hormone in the cockroach. *Life Sci.*, 17:323~328

Hammock B D, Mumby S M, Lee P W. 1977. Mechanisms of resistance to the uvenoid methoprene in the housefly, *Musca domestica* L. *Pestic. Biochem. Physiol.* 7:261~272

Hammock B D, Quistad G B. 1981. Metabolism and mode of action of juvenile hormone, juvenoids and other insect growth regulators. *Progr. Pestic. Biochem.*, 1:1~83

Hatano R, Scott J G. 1993. Anti-P450lpr antiserum inhibits the activation of chlorpyrifos to chlorpyrifos oxon in house fly microsomes. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 45:228~233

Hodgson E, Casida J E. 1961. Metabolism oxidation of N, N-dialkyl carbamates and related compounds by rat liver. *Biochem. Pharmac.*, 8:179~191

Hodgson E. 1985. Microsomal monooxygenases. In: Kerkut GA, Gilbert, LC, (eds.), *Comprehensive Insect Physiology Biochemistry and pharmacology*. vol. 11. Oxford: Pergamon Press, 647~712

Hodgson E, Silver I S, Butler L E et al. 1991. Metabolism. In: Hayes, WJJr., Laws, ERJr., (eds.), *General Principles. Handbook of Pesticide Toxicology*, vol. 1. New York: Academic Press, 107~168

Hodgson E et al. 1993. Insect cytochrome P450: Metabolism and resistance to insecticides. *Biochemical Society Transactions*, 21:1060~1065

Hung C-F, Berenbaum M R, Schuler M A. 1997. Isolation and characterization of CYP6b4, a furanocoumarin-inducible cytochrome P450 from a polyphagous caterpillar (Lepidoptera: papilionidae). *Insect Biochem Molec. Biol.*, 27:377~385

Hung C F, Harrison T L, Berenbaum M R et al. 1995. CYP6B3: A second furanocoumarin-inducible cytochrome P450 expressed in *Papilio polyxenes*. *Insect Mol. Biol.*, 4:149~160

Hung C F, Holznacher R, Connolly E et al. 1996. Conserved promoter elements in the CYP6B3 gene family suggest common ancestry for cytochrome P450 monooxygenases mediating furanocoumarin detoxification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:12200~12205

Hung C F, Praparpong H, Berenbaum M R et al. 1995. Differential induction of cytochrome P450 transcripts in *Papilio polyxenes* by linear and angular furanocoumarins. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 25:89~99

Hunt DWA, Smirle M J. 1988. Partial inhibition of pheromone production in *Dendroctonus ponderosae* (Coleoptera: Scolytidae) by polysubstrate monooxygenase inhibitors. *J. Chem. Ecol.*, 14:529~536

Johnson P, Rees H H. 1977. The mechanism of C-20 hydroxylation of  $\alpha$ -ecdysone in the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *Biochem. J.*, 168:513~520

Jones D A. 1972. Cyanogenic glycosides and their function. In: *Phytochemical Ecology* (Ed. By Harvrone J. B. ) 103~104. New York: Acad. Press

Kappler C, Kabbouh M, Durst F et al. 1986. Studies on the C-2 hydroxylation of 2-deoxyecdysone in *Locusta migratoria*.

Insect Biochem., 16:25~32

Kappler C, Kabbouh M, Durst F et al. 1988. Characterization of three hydroxylases involved in the final steps of biosynthesis of the steroid hormone ecdysones in *Locusta migratoria* (Insecta, Orthoptera). J. Steroid Biochem., 31:891~898

Kasai S, Shono T, Yamakawa M. 1998a. Molecular cloning and nucleotide sequence of a cytochrome P450 cDNA from a pyrethroid-resistant mosquito, *Culex quinquefasciatus* Say. Insect Molec. Biol., 7:185~190

Kasai S, Weerasinghe IS, Shono T. 1998b. P450 monooxygenases are an important mechanism of permethrin resistance in *Culex quinquefasciatus* Say larvae. Arch. Insect. Biochem. Physiol., 37:47~56

Kasai S, Weerasinghe IS, Shono T et al. 2000. Molecular cloning, nucleotide sequence and gene expression of a cytochrome (CYP6F1) from the pyrethroid-resistant mosquito, *Culex quinquefasciatus* Say. Insect Biochem. Molec. Biology, 30:163~171

Kayser H, Winkler T, Spindler-Barth M. 1997. 26-hydroxylation of ecdysteroids is catalyzed by a typical cytochrome P450-dependent oxidase and related to ecdysteroid resistance in an insect cell line. Eur. J. Biochem., 248:707~716

Keeley L L, Bradfield J Y, Sowa S M et al. 1994. Physiological actions of hypertrehalosemic hormones in cockroaches. In: Perspectives in Comparative Endocrinology, ed. KG Davey, P475~485. Ottawa, Can: Natl. Sci. Eng. Res. Council

Kennaugh L, Pearce D, Daly J C et al. 1993. A piperonyl butoxide synergizable resistance to permethrin in *Helicoverpa armigera* which is not due to increased detoxification by cytochrome P450. Pestic. Biochem. Physiol., 46:234~241

Krieger R I, Feeny P O, Wilkinson C F. 1972. Detoxication enzymes in the guts of caterpillars: An evolutionary answer to plant defenses. Science, 172:579~581

Lafont R, Blais C, Beydon P et al. 1983. Conversion of ecdysones and 20-hydroxy-ecdysones into 26-OIC derivatives is a major pathway in larvae and pupae of species from three insect orders. Arch. Insect Biochem. Physiol., 1:41~58

Lee SST, Scott J G. 1992. Tissue distribution of microsomal cytochrome P450 monooxygenases and their inducibility by phenobarbital in house fly, *Musca domestica* L. Insect Biochem. Molec. Biol., 22:699~711

Lindberg RLP Negishi M. 1989. Alteration of mouse cytochrome P450<sub>co</sub> substrate specificity by mutation of a single amino-acid residue. Nature, 339:632~634

Liu N, Scott J G. 1996. Genetic analysis of factors controlling levated cytochrome P450 Cyp6D1, Cytochrome b<sub>5</sub>, P450 reductase and monooxylase activities in LPR house flies *Musca domestica*. Biochem. Genet., 34:133~148

Liu N, Scott J G. 1997a. Inheritance of CYP6D1-mediated pyrethroid resistance in house fly (Diptera: Muscidae). J. Econ. Entomol., 90:1478~1481

Liu N, Scott J G. 1997b. Phenobarbital induction of CYP6D1 is due to a trans acting factor on autosome 2 in house flies, *Musca domestica*. Insec. Molec. Biol., 6:77~81

Liu N, Scott J G. 1998. Increased transcription of CYP6D1 causes cytochrome P450-mediated insecticide resistance in house fly. Insect Biochem. Molec. Biol., 28:531~535

Liu N, Tomita T, Scott J G. 1995. Allele-specific PCR reveals that the cytochrome P450<sub>1pr</sub> gene is on chromosome 1 in the house fly, *Musca domestica*. Experientia, 51:164~167

Ma R, Cohen M B, Berenbaum M R et al. 1994. Black swallowtail (*Papilio polyxenes*) alleles encode cytochrome P450s that selectively metabolize linear furanocoumarins. Arch. Biochem. Biophys., 310:332~340

Maitra S, Dombrowski S, Waters L et al. 1996. Three second chromosome-linked clustered Cyp6 genes show differential constitutive and barbital-induced expression in DDT-resistant and susceptible strains of *Drosophila melanogaster*. Gene., 180:165~171

Nelson D R, Kamataki T, Waxman D J et al. 1993. The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping accession numbers, early trivial names of enzymes and nomenclature. DNA Cell Biol., 12:1~51

Newcomb R D, Campbell P M, Ollis D L et al. 1997. A single amino acid substitution converts a carboxylesterase to an organophosphorus hydrolase and confers insecticide resistance on a blowfly. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94:7464~7468

Nigg H N, Svoboda J A, Thompson M J et al. 1974. Ecdysone metabolism: Ecdysone dehydrogenase-isomerase. Lipids, 9:

971~974

Nigg H N, Svoboda J A, Thompson MJ *et al.* 1976. Ecdysone 20-hydroxylase from the midgut of the tobacco hornworm (*Manuca sexta* L.). *Experientia*, 32:438~439

Ortiz de Montellano P R. 1995. Cytochrome P450 New York: Plenum. 2nd, ed.

Pittendrigh B, Aronstein K, Zinkovsky E *et al.* 1997. Cytochrome P450 genes from *Helicoverpa armigera*: Expression in a pyrethroid-susceptible and resistant strain. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 27:507~512

Prapaipong H, Berenbaum M R, Schuler MA. 1994. Transcriptional regulation of the *Papilio polyxenes* CYP6B1 gene. *Nucl. Acids Res.*, 22:3210~3217

Pratt G E, Kuwano E, Farnsworth D E, Feyereisen R. 1990. Structure-activity studies on 1,5-disubstituted imidazoles as inhibitors of juvenile hormone biosynthesis in isolated corpora allata of *Diptoptera punctata*. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 38:223~230

Ranasinghe C, Headlam M, Hobbs A. 1997. Induction of the mRNA for CYP6B2, a pyrethroid inducible cytochrome P450, in *Helicoverpa armigera* (Hubner) by dietary monoterpenes. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 34:99~109

Ranasinghe C, Hobbs A A. 1998. Isolation and characterization of two cytochrome P450 cDNA clones for CYP6B6 and CYP6B7 from *Helicoverpa armigera* (Hubner): Possible involvement of CYP6B7 in pyrethroid resistance. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 28:571~580

Reed J R, Quilici D R, Blomquist G J *et al.* 1995. Proposed mechanism for the cytochrome P450-catalyzed conversion of aldehydes to hydrocarbons in the house fly, *Musca domestica*. *Biochemistry*, 34:16221~16227

Reed J R, Vanderwel D, Choi S *et al.* 1994. Unusual mechanism of hydrocarbon formation in the housefly: cytochrome P450 converts aldehyde to the sex pheromone component (Z)-9-tricosene and CO<sub>2</sub>. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:10000~10004

Rees H H. 1995. Ecdysteroid biosynthesis and inactivation in relation to function. *Eur. J. Entomol.*, 92:9~39

Rhodes D F, Gates R G. 1976. A general theory of plant anti-herbivore chemistry. *Rec. Adv. Phytochem.*, 10:168~213

Ronis M J J, Hodgson E, Dauterman W C. 1988. Characterization of multiple forms of cytochrome P450 from an insecticide resistant strain of house fly (*Musca domestica*). *Pestic. Biochem. Physiol.*, 32:74~90

Rose H A. 1985. The relationship between feeding specialization and host plants to aldrin epoxidase activities of midgut homogenates in larval Lepidoptera. *Ecol. Entomol.*, 10:455~467

Rose R L, Goh D, Thompson D M *et al.* 1997. Cytochrome P450 (CYP)9A1 in *Heliothis virescens*: the first member of a new CYP family. *Insect. Biochem. Molec. Biol.*, 27:605~615

Scharf M, Kaakeh W, Bennett G. 1997. Changes in an insecticide-resistant field population of German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae) after exposure to an insecticide mixture. *J. Econ. Entomol.*, 90:38~48

Scharf M E, Neal J J, Bennett G W. 1998a. Changes of insecticide resistance levels and detoxication enzymes following insecticide selection in the German cockroach, *Blattella germanica* (L.). *Pestic. Biochem. Physiol.*, 59:67~79

Scharf M E, Neal J J, Marcus C B *et al.* 1998b. Cytochrome P450 purification and immunological detection in an insecticide resistant strain of German cockroach (*Blattella germanica* L.). *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 28:1~9

Scott J A, Collins F H, Feyereisen R. 1994. Diversity of cytochrome P450 genes in the mosquito, *Anopheles albimanus*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 205:1452~1459

Scott J G. 1996. Cytochrome O450 monooxygenase-mediated resistance to insecticides. *J. Pesticide Sci.*, 21:241~245.

Scott J G. 1999. Cytochrome P450 and insecticide resistance. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 29:757~777.

Scott J G. 1996a. Inhibitors of CYP6D1 in house fly microsomes. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 26:645~649

Scott J G. 1996b. Preparation of microsomes from insects and purification of CYP6D1 from house flies. In: *Cytochrome P450* Part B. Johnson, E. F., Waterman, M. R. (eds.), *Methods in Enzymology*, vol. 272. New York: Academic Press, 287~292

Scott J G, Liu N, Wen Z. 1998. Insect cytochrome P450: Diversity, Insecticide resistance and tolerance to plant toxins. *Comp. Biochem. Physiol.*, 121c:147~155

Scott J G, Liu N, Wen Z *et al.* 1999. House fly cytochrome P450 CYP6D1: 5 prime flanking sequences and comparison of

alleles. *Gene*, 226:347~353

Scott J G, Sridhar P, Liu N. 1996. Adult specific expression and induction of cytochrome P450lpr in house flies. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 31:313~323

Smith S L, Bollenbacher WE, Cooper DY *et al.* 1979. Ecdysone 20-monoxygenase: Characterization of an insect cytochrome P450 dependent steroid hydroxylase. *Mol. Cell Endocrinol.*, 15:111~133

Smith F F, Scott J G. 1997. Functional expression of house fly (*Musca domestica*) cytochrome P450 CYP6D1 in yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 27:999~1006

Snyder M J, Stevens J L, Andersen J F *et al.* 1995. Expression of cytochrome P450 genes of the CYP4 family in midgut and fat body of the tobacco hornworm, *Manduca Sexta*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 321:13~20

Snyder M J, Glendinning J I. 1996. Causal connection between detoxification enzyme activity and consumption of a toxic plant compound. *J. Comp. Physiol. A*, 179:255~261

Spiegelman V S, Fuchs S Y, Belitsky GA. 1997. The expression of insecticide resistance-related cytochrome P450 forms is regulated by molting hormone in *Drosophila melanogaster*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 232:304~307

Srivatsan J, Weirich M, Agosin M. 1990. Cytochrome P450-catalyzed formation of 20-hydroxy ecdysone in larval housefly mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 168:1372~1377

Sun Y P, and Johnson E R. 1960. Synergistic and antagonistic actions of insecticide-synergist combinations and their mode of action. *J. Agric Food. Chem.*, 8:261~266

Sundseth S S, Kernel S J, Waters L C. 1989. Monoclonal antibodies to resistance-related forms of cytochrome P450 in *Drosophila melanogaster*. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 33:176~188

Sundseth S S, Nix C E, Waters L C. 1990. Isolation of insecticide resistance-related forms of cytochrome P450 from *Drosophila melanogaster*. *Biochem. J.*, 265:213~217

Sutherland T D, Unnithan G C, Andersen J F *et al.* 1998. A cytochrome P450 terpenoid hydroxylase linked to the suppression of insect juvenile hormone synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92(22):12884~12889

Tomita T, Liu N, Smith F F *et al.* 1995. Molecular mechanisms involved in increased expression of a cytochrome P450 responsible for pyrethroid resistance in the housefly, *Musca domestica*. *Insect Molec. Biol.*, 4:135~140

Tomita T, Scott J G 1995. cDNA and deduced protein sequence of CYP6D1: the putative gene for a cytochrome P450 responsible for pyrethroid resistance in house fly. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 25:275~283

Von Wachenfeldt C, Johnson E F. 1995. Structure of eukaryotic cytochrome P450 enzymes. New York: Plenum, 183~223

Wang X P, Hobbs A A. 1995. Isolation and sequence analysis of a cDNA clone for a pyrethroid inducible cytochrome P450 from *Helicoverpa armigera*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 25:1001~1009

Waters L C, Shaw B J, Chang L Y. 1992a. Regulation of the gene for *Drosophila* P450-B1, a P450 isozyme associated with insecticide resistance. In: Mullin, CA, Scott JG, (eds.), *Molecular Mechanisms of Insecticide Resistance*. ACS Symposium Series., No. 505. ACS, Washington DC, 41~52

Waters L C, Zelhof A C, Shaw B J *et al.* 1992b. Possible involvement of the long terminal repeat of transposable element 17.6 in regulating expression of an insecticide resistance-associated P450 gene in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4855~4859

Weirich G F, Svoboda J A, Thompson M J. 1985. Ecdysone 20-monoxygenase in mitochondria and microsomes of *Manduca sexta* (L.) midgut. Is the dual localization real? *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 2:385~396

Wheelock G D, Scott J G. 1990. Immunological detection of cytochrome P450 from insecticide resistant and susceptible house flies (*Musca domestica*). *Pestic. Biochem. Physiol.*, 38:130~139

White RA Jr, Franklin R T, Agosin M. 1979. Conversion of  $\alpha$ -pinene to  $\alpha$ -pinene oxide by rat liver and the bark beetle *Dendroctonus terebrans* microsomal fractions. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 10:233~242

Wilkinson C F. 1983. Role of mixed-function oxidases in insecticide resistance. In: Georghiou GP, Saito Y, (eds.), *Pest Resistance to Pesticides*. New York: Plenum Press, 175~206

Wilkinson C F. 1985. Role of mixed-function oxidases in insect growth and development. In: Hedin, PA, (eds.), *Bioregu-*

lators for Pest Control. ACS Symp. Ser. No. 276. American Chemical Society, Washington DC, 161~176

Williamms D R, Chen J H, Fisher M J, Rees H H. 1997. Induction of enzymes involved in molting hormone (ecdysteroid) inactivation by ecdysteroids and an agonist, 1,2-dibenzoyl-1-tert-butyl-hydrazine (RH-5849). *J. Biol. Chem.*, 272: 8427~8432

Wojtasek H, Leal W S. 1999. Degradation of an alkaloid pheromone from the pale-brown chater, *Phyllopertha diversa* (Coleoptera Scarabacidae), by an insect of factory cytochrome P450. *FEBS letter*, 458: 333~336

Wu D, Scharf M E, Neal J J, Suiter D R *et al*. 1998. Mechanisms of fenvalerate resistance in the German cockroach *Blattella germanica* (L.). *Pestic. Biochem. Physiol.* 61:53~62

Yu S J. 1986. Consequences of induction of foreign compound-metabolizing enzymes in insects. In *Molecular Aspects of Insect-Plant Interactions*, L B Brattsten, S Ahmad, (ed). P211~255. New York: Plenum

Yu S J, Terriere L C. 1974. A possible role for microsomal oxidases in metamorphosis and reproduction in the housefly. *J. Insect Physiol.*, 20:1901~1912

Yu S J, Terriere L C. 1975a. Activities of hormone metabolizing enzymes in houseflies treated with some substituted urea growth regulators. *Life. Sci.*, 17:619~626

Yu S J, Terriere L C. 1975b. Microsomal metabolism of juvenile hormone analogs in the housefly. *Musca domestica*. L. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 5:418~430

Yu S J, Terriere L C. 1977a. Ecdysone metabolism by soluble enzymes from three species of diptera and its inhibition by the insect growth regulator TH-6040. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 7:48~55

Yu S J, Terriere L C. 1977b. Esterase and oxidase activity of housefly microsomes against juvenile hormone analogues containing branched chain ester groups and its induction by phenobarbital. *J. Agric. Fd. Chem.*, 25:1333~1336

Yu S J, Terriere L C. 1977c. Metabolism of [<sup>14</sup>C] hydropene (ethyl 3,7,11-trimethyl-2,4-dodecadienoate) by microsomal oxidases and esterases from three species of diptera. *J. Agric. Fd. Chem.*, 25:1076~1080

Zhang M, Scott J G. 1994. Cytochrome b<sub>5</sub> involvement in cytochrome P450 monooxygenase activities in house fly microsomes. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 27:205~216

Zhang M, Scott J G. 1996. Cytochrome b<sub>5</sub> is essential for cytochrome P450 6D1-mediated cypermethrin resistance in LPR house flies. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 55:150~216

Zhang M, Scott J G. 1996. Purification and characterization of cytochrome b<sub>5</sub> reductase from the house fly, *Musca demestica*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 113B:175~183

## 第九章 微生物的细胞色素 P450 及其功能

### 9.1 真菌的细胞色素 P450 及其功能

丝状真菌(*Filamentous fungi*)又称霉菌,广泛分布于自然界,土壤、植物、有机废物材料上都有霉菌的存在。真菌对不同碳和氮源代谢的能力是它们生存的条件。真菌可以通过产生于细胞外和细胞内的有关酶来降解复杂生物多聚体。此外,真菌还可以分泌不同类型的初级和次级代谢物(如抗生素)以催化许多不同结构的复杂化合物如环芳烃和甾醇化合物的羟基化。生物化学证据表明,这些生物转化反应通常是 P450 酶系介导的,P450 介导的转化步骤是许多特异性真菌生物转化作用的一部分。

遗憾的是,认为 P450 酶参与某些反应通常是基于一些非结论性的试验,如根据对 NADPH 的依赖性以及 P450 抑制剂的抑制作用。研究得最深入的反应是多环芳烃如苯并芘的降解、甾醇(如黄体酮,羊毛甾醇)的生物转化和长链烷烃的同化。

#### 9.1.1 真菌细胞色素 P450 的催化反应

##### 9.1.1.1 多环芳烃和生物转化

多环芳烃(PAH)由 3 个或 3 个以上的芳香环组成,不易被微生物降解,被认为是环境污染治理的难题。有些 PAH,如苯并芘已知是强的致癌物(Pelkonen and Nebert,1982)。

不同的霉菌如美丽小克银汉霉(*Cunninghamella elegans*),班尼小克银汉霉(*C. bainieri*),深黄被孢霉(*Mortierella isabellina*)及蚕白僵菌(*Beauveria bassiana*)具有羟基化一种或多种 PAH 的能力(Sutherland,1992;Cerniglia *et al.*,1983,1992;Cerniglia,1984;Griffiths *et al.*,1991,1993;Holland *et al.*,1987,1994;Holland,1992)。从石油污染的地区分离筛选了一些真菌,其中发现微紫青霉(*Penicillium janthinellum*)具有很高的降解芘类物质的能力(Launen *et al.*,1995)。从腐生和植物病原担子菌中也筛选出具有强的降解芘能力的真菌 *Crinipellis stiparia* (Wunder *et al.*,1994;Lambert *et al.*,1994;Lange *et al.*,1994)。

##### 9.1.1.2 甾醇分子的生物转化

另一类深入研究的生物转化是药用甾醇,特别是孕甾酮的立体特异性羟基化作用(Mahato and Majumdar,1993)。已知具有甾醇羟基化作用的真菌见下表,甾醇不同部位的羟基化可以由不同种类的真菌来完成(Vitas *et al.*,1995;Rozman and Komel,1992)(图 9.1,表 9.1)。

在一些真菌中,P450 酶实际参与孕甾酮位点特异性的羟基化作用已有报道,如美丽小克银汉霉(*C. elegans*)(Dlugonski *et al.*,1991)、拟青霉(*Paecilomyces lilacinus*)(Vitas

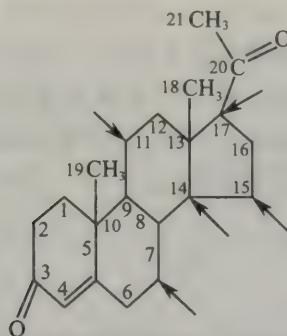


图 9.1 真菌孕甾酮的羟基化,箭头表明不同真菌羟基化作用的位点

et al., 1995)、黑色根霉 (*Rhizopus nigricans*) (Breskvar et al., 1991)。Ahmed et al. (1995) 通过从布拉氏须霉 (*Phycomyces blakesleeanus*) 中纯化出孕甾酮羟基化作用的酶, 再重组酶系, 证明了细胞色素 P450 在这一生物转化中的作用。Breskvar et al. (1991) 从黑色根霉中克隆了甾醇羟基化酶的部分序列。

表 9.1 不同真菌的甾醇羟基化作用部位

真菌	羟基化作用部位	真菌	羟基化作用部位
赭色曲霉 <i>Aspergillus ochraceus</i>	11 $\alpha$ -羟基化	梨形毛霉 <i>Mucor piriformis</i>	14 $\alpha$ -羟基化
葡萄座腔菌 <i>Botryosphaeria obtusa</i>	7 $\beta$ -羟基化	布拉氏须霉 <i>Phycomyces blakesleeanus</i>	7 $\alpha$ -羟基化
旋孢霉 <i>Cochliobolus lunatus</i>	11 $\beta$ -羟基化		

细胞色素 P450 介导的甾醇的是酵母的羊毛甾醇 14 $\alpha$ -脱甲基作用以及霉菌的齿孔醇 (eburicol) 14 $\alpha$ -脱甲基作用。产物是麦角甾醇 (ergosterol), 其结构与哺乳动物的胆固醇类似, 具有保持膜的流动性的功能, 也为完成细胞周期所必须的 (Vanden Bossche, 1990)。许多农业和药理上重要的杀菌剂的作用机制是抑制该酶的活性 (Vanden Bossche, 1990; Kapteyn et al., 1992)。

### 9.1.1.3 烷烃生物转化 (alkane bioconversion)

一些假丝酵母属 (*Candida*) 真菌的 P450 可以催化烷烃的同化或降解, 如麦牙糖假丝酵母 (*Candida maltosa*), 热带假丝酵母 (*C. tropicalis*) 及 (*C. apicola*)。这些转化作用包括  $n$ -烷烃的末端羟基化和脂肪酸的  $\omega$ -羟基化作用, 参与这些反应的 P450 是烷烃可诱导的细胞色素 P450 (Scheller et al., 1996)。在其他真菌也发现类似的生物转化反应 (Van Dyk et al., 1994)。一些酶的对应基因已被克隆 (表 9.2)。

### 9.1.1.4 其他 P450 介导的真菌生物转化

真菌一些其他的生物转化作用也是由 P450 催化的, 包括豌豆素 (pisatin) 脱甲基作用 (如丛赤壳菌 *Nectria haematococca*) (Weltring et al., 1988), 苯甲酸酯的对-羟基化作用 (如黑色曲霉 *Aspergillus niger*) (Van Gorcom et al., 1990; Boschloo et al., 1990) 以及 NO 还原 (尖孢镰孢 *Fusarium oxysporum*) (Shoun and Tanimoto, 1991)。一个特殊的细胞色素 P450 (P450 foxy) 参与脂肪酸  $\omega$ -1,  $\omega$ -3 羟基化, 该 P450 是从尖孢镰孢中分离的, 是

融合蛋白,包括类似细胞色素 P450 的结构域和类似细胞色素 P450 还原酶的结构域,因此,不再需要细胞色素 P450 还原酶作电子供体(Nakayama *et al.*, 1996)。类似的蛋白(可溶性脂肪酸羟化酶 P450 BM3)在巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)中也发现(Narhi and Fulco, 1986)。P450 foxy 与 P450 BM3 都有很高的转换速率,这是因为它们的电子供体结构域和 P450 结构域紧密联结。

### 9.1.2 真菌 P450 基因

生物化学技术鉴定真菌细胞色素 P450 酶受 P450 纯化困难的严重阻碍,因此克隆 P450 蛋白的对应基因有助于真菌 P450 的研究。所有已分离的真菌细胞色素 P450 基因都归在 51-66 家族(Nelson *et al.*, 1996)(表 9.2)。

表 9.2 真菌细胞色素 P450 基因

CYP	生物	功能(俗名)
CYP51	意大利青霉 <i>Penicillium italicum</i> 啤酒酵母 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 白色假丝酵母 <i>Candida albicans</i> <i>Candida glabrata</i> 季也蒙氏假丝酵母 <i>Candida guilliermondii</i> 近平滑假丝酵母 <i>Candida parapsilosis</i> 热带假丝酵母 <i>Candida tropicalis</i> 克普斯氏假丝酵母 <i>Candida krusei</i> 玉蜀黍黑粉菌 <i>Ustilago maydis</i> 粟酒裂殖糖酵母 <i>Schizosaccharomyces pombe</i> 马克斯克谱维氏酵母 <i>Kluyveromyces marxianus</i>	麦孔醇/羊毛甾醇 14 $\alpha$ -脱甲基(14DM)
CYP52A3	麦芽糖假丝酵母 <i>Candida maltosa</i>	<i>n</i> -烷烃同化
CYP52A4	<i>C. maltosa</i>	同上
CYP52A5	<i>C. maltosa</i>	同上
CYP52A9	<i>C. maltosa</i>	同上
CYP52A10	<i>C. maltosa</i>	同上
CYP52A11	<i>C. maltosa</i>	同上
CYP52C2	<i>C. maltosa</i>	同上
CYP52D1	<i>C. maltosa</i>	同上
CYP52A1	热带假丝酵母 <i>C. tropicalis</i>	同上
CYP52A2	<i>C. tropicalis</i>	
CYP52A6	<i>C. tropicalis</i>	
CYP52A7	<i>C. tropicalis</i>	
CYP52A8	<i>C. tropicalis</i>	
CYP52B1	<i>C. tropicalis</i>	
CYP52C1	<i>C. tropicalis</i>	
CYP52E1	<i>C. apicola</i>	<i>n</i> -烷烃同化
CYP52E2	<i>C. apicola</i>	
CYP53A1	黑色曲霉 <i>Aspergillus niger</i>	苯甲酸对-羟化酶(BPH)
CYP53B1	小红酵母 <i>Rhodotorula minuta</i>	苯甲酸对-羟化酶,异丁烯转化
	蚕白僵菌 <i>Beauveria bassiana</i>	苯甲酸对-羟化酶
CYP54	粗糙链孢菌 <i>Neurospora crassa</i>	未知

续表

CYP	生物	功能(俗名)
CYP55A1	尖头镰孢 <i>Fusarium oxysporum</i>	NO 还原, 可溶性, (P450norA, P450norB)
CYP55A2	<i>Cylindrokarpon tonkinense</i>	NO 还原, 线粒体 (P450nor1)
CYP55A3	<i>Cylindrokarpon tonkinense</i>	NO 还原, 可溶性 (P450nor2)
CYP56	<i>S. cerevisiae</i>	二酷氨酸形成 (DIT2)
CYP57A1	<i>Nectria haematococca</i> T9	豌豆素脱甲基作用 (PDA)
CYP57A2	<i>Nectria haematococca</i>	
CYP59	<i>Aspergillus nidulans</i>	柄曲霉素生物合成 (stos/verA)
CYP58	拟分枝孢镰孢 <i>Fusarium sporotrichioides</i>	Trichothecene 生物合成 (Tri4)
CYP60A1	<i>Aspergillus parasiticus</i>	Ord1, O-甲基柄曲霉素 → 黄曲霉毒素
CYP60A2	构巢曲霉 <i>Aspergillus nidulans</i>	柄曲霉素生物合成 (stc F)
CYP60B	<i>Aspergillus nidulans</i>	柄曲霉素生物合成 (stc L)
CYP61	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	甾醇 $\Delta^{22}$ -去饱和酶, 麦角甾醇生物合成 (erg 5)
CYP62	<i>Aspergillus. nidulans</i>	柄曲霉素生物合成 (stc B)
CYP63	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	未知
CYP64	黄包曲霉 <i>Aspergillus flavus</i>	Ord1, 同 CYP60A1
CYP65	<i>F. sporotrichioides</i>	Trichothecene 生物合成 (tri 11)
CYP66	双孢蘑菇 <i>Agaricus bisporus</i>	受生长发育调节的基因, 类似 CYP64

编码齿孔醇或羊毛甾醇  $14\alpha$ -脱甲基酶 (EDM, CYP51 或 P450<sub>14DM</sub>) 的 CYP51 家族基因是研究得最清楚的真菌 P450 基因家族之一。甾醇  $14\alpha$ -脱甲基酶是麦角甾醇生物合成途径的限速酶, 编码 CYP51 的 P450 基因已从一些生物, 如啤酒酵母 (*S. cerevisiae*), 意大利青霉 (*Penicillium italicum*), 粟啤酒糖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) 和玉蜀黍黑粉菌 (*Ustilago maydis*) 中克隆出, 许多吡咯杀菌剂是针对这种 P450 酶, 因此 CYP51 及其基因也是农业研究中诱人的主题 (Vanden Bossche, 1990)。最近因免疫缺陷 (immuno-deficiency) 疾病的病人增多, 所以  $14\alpha$ -脱甲基酶抑制剂 (DMIs) 更加引起人们的兴趣。真菌侵染 (特别是假丝酵母 *Candida* 和曲霉 *Aspergilli*) 引起的这类疾病难以用现有的杀菌剂治疗。运用分子遗传学的方法已在许多这类真菌中分离了 CYP51 基因 (Morace *et al.*, 1997; Geber *et al.*, 1995)。参与麦角甾醇生物合成途径的第二个细胞色素 P450 编码基因已在啤酒酵母中发现 (Skaggs *et al.*, 1996), 这个 erg5 基因 (CYP61) 编码甾醇  $\Delta^{22}$ -脱饱和酶 (desaturase), 该基因与哺乳动物细胞色素 P450 有明显的同源性 (homology), 而与 P450<sub>14DM</sub> 同源性有限。

CYP52 是个大的基因家族, 至少包括 8 个参与 *n*-烷烃同化的基因已从一些假丝酵母种类中鉴定出。各基因的底物特异性不同, 使生物体具有修饰许多不同 *n*-烷烃的能力 (Seghezzi *et al.*, 1992, 1991; Schelleret *et al.*, 1996)。

参与 PAH 羟基化作用的全长 P450 基因尚未见报道, 但参与较小的芳环化合物羟基化的 P450 基因已被分离, 从 *A. niger* (bphA, Cyp53) (Van Gorcom *et al.*, 1990) 中分离了编码苯甲酸酯对-羟基化酶, 从小红酵母 (*Rhodotorula minuta*) (Fukuda *et al.*, 1994) 和蚕白僵菌 (*Beauveria bassiana*) 中克隆了同源的 CYP53 基因。L-苯丙氨酸可诱导小红酵母的 CYP53, 该 P450 可以转化苯甲酸酯 → 对-羟基苯甲酸酯以及催化异戊酸 → 异丁烯

(Fukuda *et al.*, 1994), 但 CYP53 体内作用现在还不清楚。

参与 NO 还原的异常细胞色素 P450 基因 (CYP55) 已从尖孢镰孢中被克隆 (Kizawz *et al.*, 1991)。它与其他真核细胞细胞色素 P450 不同, 其编码酶 P450nor 是可溶性的, 依赖于 NADH(而非 NADPH), 存在于细胞质中(而非内质网), 且不同于其他所有真菌 P450 酶, P450nor 不依赖电子供体酶发挥其催化功能 (Kizawa *et al.*, 1991; Nakahara *et al.*, 1993)。现在有 2 个 P450nor 同工酶存在, 一个位于细胞质中, 一个推定在线粒体中。这两个同工酶被认为由相同基因编码, 通过差别 N-末端加工形成 (Nakahara and Shoun, 1996)。另一个类似的系统发现于反硝化真菌 (*Cylindrokarpon tonkinense*) 中, 与尖孢镰孢由一个基因编码两个蛋白有所不同, 它有两个独立的 CYP55 基因, 不同基因编码的蛋白对 NADPH 或 NADH 作电子供体的选择性不同。这一结果表明, *C. tonkinense* 的 CYP55 同工酶, 不同于其他的细胞色素 P450, 各有自己的 NADPH 和 NADH 的结合部位 (Kudo *et al.*, 1996)。

一些参与植物致病的真菌也表达 P450 酶。丛赤壳菌的豌豆素去甲基酶 (PDM) 是第一个发表的例子 [豌豆 (*Pisum sativum L.*) 的病原菌]。豌豆素是由植物分泌作为抗微生物剂, PDM 参与豌豆素的脱甲基作用 (Van Etten *et al.*, 1989)。编码 PDM 的基因 (*pda*, CYP57) 已从高致病性的 PDA-T9 和从不致病性的 PDA6-1 *N. haematococca* 株中分离的 (Weltring *et al.*, 1988; Maloney and Van Etten, 1994; Reimann and Van Etten, 1994)。PDA-T9 *pda* 基因可被豌豆素诱导, 诱导由存在于 PDA-T9 *pda* 基因的转录调控区的 35-bp DNA 元件 (豌豆素响应元件) 介导 (Straney and Van Etten, 1994)。在不致病性 PDA6-1 真菌中导入 PDA-T9 基因, PDA6-1 获得了快速解毒豌豆素的能力 (Schager *et al.*, 1989; Weltring *et al.*, 1988)。在 PDA-*N. haematococca* 菌株中导入 PDA-T9 基因, 所有的转化体都能解毒豌豆素, 但仅有 1/3 的受体菌表现出明显提高对豌豆的侵人性, 且所有的受体菌其侵人性都不如 PDA<sup>+</sup> 菌株 (如 PDA-T9) 高。这个结果表明 PDA 对于病菌的侵人性是重要的, 但不是惟一的 (Ciuffetti and Van Etten, 1996)。

与植物致病有关的另两个细胞色素 P450 基因已从植物病原菌拟分枝孢镰孢 (*Fusarium sporotrichioides*) 中分离出。在这种菌中, 侵人性增强需先产生倍半萜 trichothecene (Desjardins *et al.*, 1992)。trichothecene 生物合成途径的基因以基因簇的方式存在 (Hohn *et al.*, 1993), 其中两个是属于细胞色素 P450, 即 *Tri4* (CYP58, Hohn *et al.*, 1995) 和 *Tri 11*。

与毒素产生有关的 P450 已在产生黄曲霉毒素 (aflatoxinogenic) 的真菌如寄生曲霉 (*Aspergillus parasiticus*) 和黄色曲霉 (*A. flavus*) 中发现 (Keller and Hohn, 1997)。非产黄曲霉毒素的构巢曲霉 (*A. nidulans*), 除缺少由柄曲霉素转化为黄曲霉毒素所需的基因外, 具有完全的合成黄曲霉毒素前体柄曲霉素的所有酶。与 trichothecene 生物合成途径相似, 编码构巢曲霉柄曲霉素生物合成的酶位于一个基因簇上。此基因簇包含 25 个开放读框 (stcA-stcX 以及 aflR), 其中 4 个基因 *stcB* (CYP62), *stcF* (CYP60A2), *stcL* (CYP60B) 和 *stcS* (CYP59) 是细胞色素 P450 (Brown *et al.*, 1996; Keller *et al.*, 1995)。黄曲霉毒素合成的最后一步即转化柄曲霉素为黄曲霉毒素的 P450 基因, 已从产生黄曲霉毒素的寄生曲霉 (CYP60A1) 和 *A. flavus* (CYP64) 中分离出。

从粗糙链孢霉 (*Neurospora crassa*) 获得唯一一个 P450 基因 CYP54。这个基因的表

达可被放线菌酮(cycloheximide)诱导,但其功能还不清楚(Attar *et al.* 1990)。从两个无隔担子菌(*homobasidiomycetous*, *Phanerochaete chrysosporium* 和双孢蘑菇(*Agaricus bisporus*)中发现另两个 P450 序列,即 CYP63,CYP66。

啤酒糖酵母基因组的全序列已测出。这一生物体 P450 基因的种类很少,包括编码甾醇 14 $\alpha$ -脱甲基酶的 *CYP51* 基因以及参与合成二酪氨酸的 *dit2* 基因。二酪氨酸是酵母芽孢壁表面层的重要化合物。另外,啤酒糖酵母中的甾醇 $\Delta^{22}$ -去饱和酶(*erg 5*, *CYP61*; Skaggs *et al.*, 1996)已被鉴定是 P450。很明显,酿酒酵母所有 P450 基因参与管家(housekeeping)活性,而在酵母中未发现存在于其他真核生物的参与许多非必需的解毒反应或复杂次生性物质合成的 P450 基因。

### 9.1.3 真菌细胞色素 P450 酶系的调控

如同哺乳动物一样,许多真菌的细胞色素 P450 可被底物诱导。P450 的活性依赖于电子供体蛋白即 P450 还原酶(CPR)的活性,CPR 的表达水平应与不同 P450 的表达水平相适应。P450 与 CPR 的共同调控已有报道,以 *Aspergillus ochraceus* 为例,孕酮可以诱导细胞色素 P450 介导的孕酮 11 $\alpha$ -羟化酶活性,是 P450 活性以及 CPR 活性诱导的结果(Ghosh *et al.*, 1983)。P450 与 CPR 活性共调节的现象在其他几种真菌 P450 系统中也发现(Baillie, 1993; Bhatnagar *et al.*, 1982; Dutta *et al.*, 1983),表明 P450 与 CPR 的共调节是真菌的共同特征。

*Cyp52* 在 *C. maltosa* 中的表达可能被 *n*-烷烃诱导(Ohkuma *et al.*, 1995; Sutter *et al.*, 1990)。将 CPR 启动子与 *Kluyveromyces lactis* 报告基因 *Lac* 融合形成的结构转化到 *C. maltosa* 菌株,发现 CPR 活性的调控是在转录水平(Ohkuma *et al.*, 1995; Sutter *et al.*, 1990)。这些结果清楚地表明 *Candida* 存在转录调控机制,导致 CPR 和 *CYP52* 表达水平的共调控。*A. niger* 细胞色素 P450 参与苯甲酸代谢,其 P450 基因 *bphA* 和 P450 还原酶基因 *CPRA* 可被底物苯甲酸所诱导, *bphA* 和 *cprA* mRNA 的诱导分别大于 100 倍和小于 20 倍(Van den Brink *et al.*, 1995; Van den Brink *et al.*, 1998)。但 *cprA* 和 *bphA* mRNA 水平的增加并不伴随 CPR 和 BPH 活性水平的增加(Van Gorcom *et al.*, 1990; Van den Brink *et al.*, 1995, 1996a; Van den Brink *et al.*, 1998)。将 *bphA* 和 *cprA* 启动子分别与编码报告基因 *LacZ* 的半乳糖苷酶(galactosidase)以及编码报告基因 *uidA* 的葡萄糖苷酸酶(glucuronidase)融合,研究发现报告基因 mRNA 水平被诱导超过 20 倍,但报告酶的活性仅诱导 3~5 倍(Van den Brink *et al.*, 1998)。且经苯甲酸诱导后,大多数 *cprA* 的转录物分子更大。这些数据表明,除转录调节外,也存在转录后调节机制。

研究得最清楚的真菌 P450 是 *pda* 基因(*N. haematococca*),这个基因可被其底物豌豆素高度诱导。启动子缺失研究(Ruan and Straney, 1996)以及电泳分析实验(Straney and Van Etten, 1994; He *et al.*, 1996)揭示诱导作用是由 *pda* 基因启动子区的一段 35-bp 长的 DNA 序列(称豌豆素响应元件)起作用。

在霉菌中特定 P450 酶系的底物诱导作用可能并非是普遍的特征。用 P450 的通用诱导剂苯巴比妥处理 *A. ochraceus* 和 *A. parasiticus* 的菌丝体,可使 CPR 活性以及苯并芘羟化酶活性增加 3~5 倍(Ghosh *et al.*, 1983; Bhatnagar *et al.*, 1982)。但苯巴比妥或

苯并芘处理并不影响 *Aspergillus fumigatus* 的 CPR 活性(Baillie, 1993), 也不影响 *A. niger* CPR mRNA 含量(Van den Brink *et al.*, 1995)。

### 9.1.4 小结

真菌 P450 参与许多生物转化过程, 包括解毒反应以及初级和次级代谢物的产生。P450 活性可以通过同时扩增 P450 和 CPR 基因的拷贝数而得到提高, 这种 P450 超量表达体系可以在生物除污以及甾醇生产各方面得到应用。另外, 可用作哺乳动物 P450 酶对药物代谢研究的有效手段。真菌 P450 表达调控机制的了解有助于对 P450 酶系普遍机制的深入认识, 也可为生物技术提供有价值的信息。

## 9.2 细菌细胞色素 P450

第一个检测出的细菌 P450 来自固氮微生物 *Bradyrhizobium japonicum* 的假菌体(bacteroids)(Appleby, 1967)。编码 3 个 P450 和 1 个 P450 假基因的基因簇已被克隆, 其中的两个 P450 酶已被纯化, 但未发现它们具有氮固定的作用(Tully and Keister, 1993)。

放线菌(actinomycetes)具有不同的生物型, 可表达许多宽底物特异性的酶, 这可能是它们在不利环境条件下生存的重要内容, 因为它们必须依赖不同的氮源(Okeefe and Harder, 1991)。从放线菌目细菌中鉴定的 P450, 具有催化烷烃的羟基化作用、五氯苯酚脱卤作用、烷氧苯酚 O-脱烷基作用(Kailson *et al.*, 1993)。菌株编码参与除草剂 EPTC (S-ethyl dipropyl-carbamothioate) 降解的细胞色素 P450 已从红球菌属(*Rhodococcus* sp.)菌株 N186/21 中克隆并在大肠杆菌中超量表达(Nagy *et al.*, 1995)。分解磺酰脲类除草剂的 P450 已从线灰链霉菌(*Streptomyces griseolus*) ATCC11796 中鉴定出, 并从中分离出两个 P450 基因, 且纯化出其编码的蛋白, 这两个 P450 都可被磺酰脲和苯巴比妥诱导(O-keefe *et al.*, 1991)。其他链霉菌属(*Streptomyces*)细菌的 P450 包括西唐氏链霉菌(*S. setonii*)中邻甲氧基苯酚(guaiacol)脱甲基作用的 P450 和灰包链霉菌(*S. griseus*)中异生素转化作用的 P450 soy (Trower *et al.*, 1989)。从小单孢属(*Micromonospora griseorubida*)中分离了编码参与 mycinamicin 抗生素生物合成的 P450(Inouye *et al.*, 1994), 从 *Amylocatina autotrophica* 中分离编码维生素 D-3 25-羟基酶基因(Kawauchi *et al.*, 1994)。在哺乳动物中, 由 D-3 转化为其活性型需要 2 个羟基化步骤即 1 $\alpha$  和 25-羟基化。

至于芽孢杆菌, 已从巨大芽孢杆菌(*B. megaterium*)ATCC14581 中检测出 2 个 P450 活性。P450 BM1 和 P450 BM2 可被巴比妥(barbiturate)诱导, P450 BM1 的 Barbi 盒位于 5' 侧翼区。P450 BM1 是含 410 氨基酸, 分子质量为 48kDa 的蛋白, 与 P450 cam 最相似(He *et al.*, 1989)。P450 BM2 是 48kDa 脂肪酸羟化酶(Narhi and Fulco, 1987)。P450 BM1, BM2, BM3 在 *B. megaterium* 12 个 ATCC 株的 11 个都存在, 但在 ATCC13368 中未检出, 该菌株包括一个类型 1 的 P450 (P450meg), 它可以在 15 $\beta$  位置羟基化不同的甾醇。P450meg 基因已被克隆和测序, 但其生理功能尚不肯定(Rauschenbach *et al.*, 1993)。

奈瑟氏球菌科( *Neisseriaceae* )中, 醋酸钙不动杆菌(*Acinetobacter calcoaceticus*)的几个株系的 P450 可被 n-烷烃诱导。从生长在十六烷的 *A. calcoaceticus* EB104 株纯化了烷

羟化酶(P450)。莫拉氏菌属(*Moraxella*)菌株 Gu2 表达一种分子质量为 52kDa 的 P450, 为其在木质素降解产物中生长所需, 该酶可能是烷氧苯酚(alkoxyphenol)脱甲基酶(Asperge and Kleber, 1991)。

表 9.3 细菌的细胞色素 P450 及其功能(Munro 和 Lindsay, 1996)

CYP	名称	来源	功能或性质
CYP101	P450cam	恶臭假单孢菌 <i>P. putida</i>	樟脑羟化酶
CYP102	P450BM-3	巨大芽孢杆菌 <i>B. megaterium</i>	脂肪酸羟化酶
CYP103	P450pin F1	<i>A. tumefaciens</i>	植物可诱导
CYP104	P450pin F2	<i>A. tumefaciens</i>	植物可诱导
CYP105A1	P450sul	线状链霉菌 <i>S. griseolus</i>	除草剂可诱导
CYP105B1	P450su2	<i>S. griseolus</i>	除草剂可诱导
CYP105A2	P450VD25	<i>A. autotrophica</i>	维生素 D-3 羟化酶
CYP105C1	P450(choP)	链霉菌 <i>Streptomyces</i> sp.	
CYP105D1	P450soy	灰孢链霉菌 <i>S. griseus</i>	异生素转化
CYP106A1	P450BM-1	巨大芽孢杆菌 <i>B. megaterium</i>	脂肪酸羟化酶
CYP106A2	P450meg	<i>B. megaterium</i>	甾醇羟基化
CYP107A1	P450ergF	<i>S. erythraea</i>	红霉素生物合成
CYP107E1	P450(mycG)	<i>M. griseorubida</i>	Mycinamicin 生物合成
CYP108	P450terp	<i>Pseudomonas</i> sp.	萜品醇氧化
CYP111	P450lin	求知假单孢菌 <i>P. incognita</i>	里哪醇 8-甲基羟化酶
CYP112	P450BJ-1	<i>B. japonicum</i>	厌氧表达
CYP114	P450BJ-3	<i>B. japonicum</i>	厌氧表达
CYP117	P450BJ-4	<i>B. japonicum</i>	厌氧表达
CYP113A1	P450eryK	红霉素链霉菌 <i>S. erythraea</i>	红霉素生物合成
CYP115P	P450BJ-2	<i>B. japonicum</i>	P450 假基因
CYP116		红球菌属 <i>Rhodococcus</i> sp. N286/21 菌株	除草剂降解

P450 参与烷烃的氧化已在发光弧菌(*Vibrio fisheri* V. Lahrveyi)和明亮发光杆菌(*Photobacterium phosphoreum*)中鉴定出, 这些细菌氧化醛而发光。在弧菌属(*Vibrio*)和发光杆菌属(*Photobacterium*)的其他种类也有组成型 P450 的存在。

从生长于里哪醇(linalool)的未知假单孢菌(*Pseudomonas incognita*)的一个菌株中分离了两个细胞色素 P450, 它们催化里哪醇降解途径的两个不同的反应(Sligar and Murray, 1986), 其中里哪醇 8-甲基羟化酶(P450lin)已被克隆和测序(Ropp *et al.*, 1993)。P450cym 是从 *P. putida* PL-分离的, 羟基化  $\rho$ -伞花烃( $\rho$ -cymene)产生枯叶醇(cumic alcohol)以作碳源(Sligar and Murray, 1986)。

研究得较清楚的细菌 P450 有以下 4 种:

1) P450cam 恶臭假单孢菌(*P. putida*)ATCC17453 的 P450cam 发现于 1965 年, 它催化单萜 D-樟脑 5-外-羟基化作用, 随后樟脑降解为乙酸和异丁酸以提供代谢所需(Martinis *et al.*, 1991)。编码 P450cam 的基因(*camC*)以及许多樟脑降解途径中的其他酶位于 230kb 的 CAM 质粒上。*cam C* 基因已克隆并在大肠杆菌中得到功能表达(Unger *et al.*, 1986)。

P450cam 被 NADH 还原, 电子传递经过铁-硫蛋白假单孢氧还蛋白和含 FAD 的假单

孢氧还蛋白还原酶,它们分别由 *cam B* 和 *cam A* 编码,位于 *cam C* 的 3' 区。另一基因 *cam D* 编码 5-外-羟基樟脑还原酶,位于 *cam A* 和 *cam B* 的 5' 区。这 4 个基因组成一个操纵子 *cam DCAB*,编码樟脑降解开始步骤所需要的酶。该操纵子被二聚体阻遏蛋白即 *cam R* 基因的蛋白产物负调节, *cam R* 位于 *cam D* 前,其转录方向与 *cam DCAB* 相反。*cam A* 和 *cam B* 已被克隆和测序。完整的 P450 酶系(P450cam、假单孢氧还蛋白以及假单孢氧还蛋白还原酶)已在大肠杆菌中表达(Peterson *et al.*, 1990)。*cam R* 基因也已测序(Aramaki *et al.*, 1994)。

2) P450 BM3 20 世纪 70 年代中期从巨大芽孢杆菌(*B. megaterium*)中发现了具有脂肪酸羟基化活性的 P450,已从芽孢杆菌中将 P450 BM3 纯化到同质,它快速催化链长大约 C12~C18 的饱和脂肪酸的加单氧酶活性,其中对 C15 和 C16 脂肪酸的活性最高,可达 4000/(mol·min)。其他底物包括相似链长的单不饱和脂肪酸、脂肪族醇和脂肪酰胺(Narhi and Fulco, 1986),脂肪酸酯不是 P450 BM3 的底物。脂肪酸底物的羟基化作用一般在  $\omega$ -2 位置,也可发生在  $\omega$ -1 和  $\omega$ -3 (Miura and Fulco, 1974)。棕榈酸羟基化产物可以进一步作氧化作用的底物而进一步羟基化(Boddupalli *et al.*, 1990)。不饱和脂肪酸的双键也可被环氧化(Buchanan and Fulco, 1978)。

P450 BM3 分子质量很大,119kDa,仅需底物和 NADPH 就有全活性(Narhi and Fulco, 1986)。1mol 纯化的 P450BM3 包含 1mol FAD、FMN 和血红素。可以催化细胞色素 C 以及其他人工电子受体(Narhi and Fulco, 1986, 1987)。水解酶部分水解 P450 BM3 得到两个结构域,其中 66kDa 多肽包含两分子黄素,保持还原酶活性;另一结构域为 55kDa 的血红素结构域,可与底物结合,也可与 CO 结合,在 450nm 有吸收峰(Narhi and Fulco, 1987)。P450 BM3 被认为是两个结构域的融合蛋白,这两个结构域分别对应于真核生物微粒体 P450 酶系的组成成分即 P450 和 NADPH P450 还原酶(Narhi and Fulco, 1987)。

编码 P450 BM3 的基因(*CYP102*)已被克隆并在大肠杆菌中得到表达,从大肠杆菌中表达的 P450 经纯化后与从巨大芽孢杆菌(*B. megaterium*)纯化的 P450 BM3 有相同的功能、免疫化学和电泳特征,其 N-末端序列也一致(Narhi *et al.*, 1988)。

P450 BM3 可被巴比妥诱导,苯巴比妥诱导 mRNA 的增加是转录增强的结果(Pike *et al.*, 1985)。细菌 P450 的巴比妥诱导十分异常,在培养基中加入 8mM 的苯巴比妥可以 28 倍诱导 P450 BM3,而苯巴比妥本身不是 P450 BM3 的底物(Narhi and Fulco, 1982)。其他巴比妥、芳基脲和酰胺也是 P450 BM3 的诱导剂。诱导剂强度的重要因素是亲脂性。最强的巴比妥诱导剂是甲丙烯基甲戊(methohexital)(Kim and Fulco, 1983)。巴比妥诱导表达需要有 P450 BM3 基因 5' 侧翼区 1kb 核苷酸序列存在(Wen *et al.*, 1989)。

3) P450terp 在  $\alpha$ -萜品油(terpinol)生长的假单孢杆菌菌株分离出另一个属于类型 I 的 P450,称为 P450terp。P450terp 可羟基化单萜,相似于 P450cam 羟基化樟脑。P450terp 基因(*CYP108*)已被克隆,其酶已被纯化,并已测定其分子结构(Hasemann *et al.*, 1994)。

4) P450eryF P450eryF 已从 *Saccharopolyspora erythaea* 中发现,这是已知的惟一一个具有生物合成功能的细菌 P450。细菌可产生红霉素(erythromycin) A。P450eryF 催化 6-deoxyerythronolide B 产生 erythronolide B, erythronolide B 是红霉素 A 这种大环内酯(macrolide)抗生素的前体(Shafiee and Hutchinsom, 1988)。从 *S. erythaea* 中鉴定

了两个 P450 酶(*orf405* 和 *eryF*),但仅 P450*eryF* 与红霉素生物合成有关。与底物结合的 P450*eryF* 的结构已鉴定(Cupp-Vickery and Poulos, 1995)。

大多数细菌 P450 催化分解过程,并非生物生存所必需的,通常它们的作用是利用特异的有机化合物。细菌具有代谢萜烯和烷烃的能力,引起人们的关注。细菌 P450 酶系具有用于有机废物和污染物处理的潜力,而且可用于药物和其他化学品合成的生物转化。细菌的底物特异性可以通过诱变进行修饰,可用于脂溶性化合物的立体氧化。许多细菌存在 P450 的强超量表达,且这些酶可以可溶性的高浓度存在在溶液中。这些性质可使人们从细菌 P450 深入认识 P450 反应机制、P450 结构-功能关系以及 P450 诱导机制。而对 P450 机制的了解可以建立工业化的工艺生产药物、化学品以及设计 P450 的抑制剂。微生物 P450 研究的进展极大地推动着整个 P450 领域的发展。

### 参 考 文 献

Ahmed F, Williams R A, Smith K E. 1995. Microbial transformation of steroids-IX. Purification of progesterone hydroxylase cytochrome P-450 from *Phycomyces blakesleeanus*. *J Steroid Biochem Mol Biol.*, 52(2):203~208

Attar R M, Grotewold E, Taccioli G E, et al. 1990. A cycloheximide inducible gene from *Neurospora crassa* belongs to the cytochrome P450 superfamily. *Nucleic Acids Res.*, 17:7535~7536

Appleby C A. 1967. A soluble haemoprotein P450 from nitrogen-fixing *Rhizobium* bacteroids. *Biochem. Biophys. Acta*, 147: 399~402

Aramaki H, Sagara Y, Takeuchi K, et al. 1994. Nucleotide sequence of the gene encoding a repressor for the cytochrome P450cam hydroxylase operon on the *Pseudomonas putida* Camplasmid. *Biochimie*, 76:63~70

Asperger O, Kleber H P. 1991. Distribution and diversity of bacterial cytochromes P450. In *Microbial and Plant Cytochromes P450: Biochemical Characteristics, Genetic Engineering and Practical Implications*. *Frontiers in Biotransformation*. Vol. 4. Ruckpaul, K., Rein, H. (eds). London: Taylor and Francis, 1~53

Baillie G S. 1993. The Characterization of Cytochromes P450 functional *Aspergillus fumigatus*. Thesis No. DX 176224, University of Canterbury, UK

Bhatnagar R K, Ahmed S, Kohli K K, et al. 1982. Induction of polysubstrate monooxygenase and aflatoxin production by phenobarbitone in *Aspergillus parasiticus*. *Biophys. Res. Commun.*, 104:1287~1292

Boddupalli S S, Estabrook R W, Peterson J A. 1990. Fatty acid monooxygenation by cytochrome P450 BM-3. *J Biol Chem.*, 265:4233~4239

Boschloo J G, Paffen A, Koot T, et al. 1990. Genetic analysis of benzoate metabolism in *Aspergillus niger*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 34:225~228

Breskvar K, Cresnar B, Plaper A, et al. 1991. Localization of the gene encoding steroid hydroxylase cytochrome P450 from *Rhizopus nigricans* inside a *Hind* III fragment of genomic DNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 178(3):1078~1083

Brown D W, Yu J H, Kelkar H S, et al. 1996. Twenty-five coregulated transcripts define a sterigmatocystin gene cluster in *Aspergillus nidulans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:1418~1422

Buchanan J F, Fulco A J. 1978. Formation of 9, 10-epoxy palmitic acid 9, 10-dihydroxypalmitate from palmitoleic acid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 85:1245~1260

Burgener-Kariruz P, Zuber J P, Jaunin P, et al. 1994. Rapid detection and identification of *Candida albicans* and *Torulopsis (Candida) glabrata* in clinical specimens by species specific nested PCR amplification of a cytochrome P450 lanosterol- $\alpha$ -demethylase (L1A1) gene fragment. *J. Clin. Microbiol.*, 32:1902~1907

Cerniglia C E. 1984. Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons. In: *Advances in Applied Microbiology* (Laskin A ed) 31~71. New York: Academic Press

Cerniglia C E, Freeman J P, Mitchum R K. 1983. Glucuronide and sulfate conjugation in the fungal metabolism of aromatic hy-

drocarbons. *Appl. Environ. Microbiol.*, 43: 1070

Cerniglia C E, Sutherland J P, Crow S A. 1992. Fungal metabolism of aromatic hydrocarbons. In: *Microbial Degradation of Natural Products* (Winkelmann G ed). 194~217. Wiley-VCH, Weinheim

Ciuffetti L M, VanEtten H D. 1996. Virulence of a pisatin demethylase deficient *Nectria haematococca* MPVI isolate is increased by transformation with a pisatin demethylase gene. *Mol. Plant-Microb. Interact.*, 9: 787~792

Cupp-Vickery J R, Poulos T L. 1995. Structure of cytochrome P450eryF involved in erythromycin biosynthesis. *Nature Struct. Biol.*, 2: 144~152

Desjardins A E, Hohn T M, McCormick S P. 1992. The effect of gene disruption of trichodiene synthase (Tox5) on the virulence of *Gibberella pulicaris*. *Mol. Plant-Microb. Interact.*, 5: 214~222

Slugonski J, Bartnicka K, Zemelko I et al. 1991. Determination of cytochrome P450 in *Cunninghamella elegans* intact protoplasts and cell-free preparations capable of steroid hydroxylation. *J. Basic. Microbiol.*, 31(5): 347~356

Dutta D, Ghosh D K, Mishra A K et al. 1983. Induction of a Benzo(α)Pyrene hydroxylase in *Aspergillus ochraccus* TS: Evidence for multiple forms of cytochrome P450. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 115(2): 692~699

Fukuda H, Fujii T, Sukita E et al. 1994. Reconstitution of the isobutene forming reaction catalyzed by cytochrome P450 and P450 reductase from *Rhodotorula minuta*: Decarboxylation with the formation of isobutene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 201: 516~522

Geber A, Hitchcock C A, Swartz J E et al. 1995. Deletion of the *Candida glabrata* erg3 and erg11 genes: Effect on cell viability cell growth sterol composition and antifungal susceptibility. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 39: 2708~2717

Ghosh D K, Dutta D, Samanta T B et al. 1983. Microsomal Benzo(α)Pyrene hydroxylase in *Aspergillus ochraceus* TS: Assay and characterization of the enzyme system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 113(2): 497~505

Griffiths D A, Best D J, Jezequel S G. 1991. The screening of selected micro-organisms for use as models of mammalian drug metabolism. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 35: 373~381

Griffiths D A, Brown D E, Jezequel S G. 1993. Metabolism of xenobiotics by *Beauveria bassiana*. *Xenobiotica*, 23: 1085~1100

Hasemann CA, Ravichndran KG, Peterson JA, Deisenhofer J. 1994. Crystal structure and refinement of cytochrome P450terp at 2.2 Å resolution. *J Mol Biol.*, 236: 1169~1185

He J S, Ruettinger R T, Liu H M et al. 1989. Molecular cloning, coding nucleotides and the deduced amino acid sequence of P450 BM-1 from *Bacillus megaterium*. *Biochem Biophys Acta*, 1009: 301~303

He J, Ruan Y, Straney D C. 1996. Analysis of determinants of binding and transcriptional activation of the pisatin responsive DNA binding factor of *Nectria haematococca*. *Mol. Plant-Microb. Interact.*, 9: 171~179

Hohn T M, Desjardins A E, McCormick S P. 1995. The Tri-gene of *Fusarium sporotrichioides*. Encodes a cytochrome P450 monooxygenase involved in trichothecene biosynthesis. *Mol. Gen. Genet.*, 248: 95~102

Hohn T M, McCormick S P, Desjardins AE. 1993. Evidence for a gene cluster involving trichothecene pathway biosynthesis genes in *Fusarium sporotrichioides*. *Curr. Genet.*, 24(4): 291~295

Holland H L. 1992. Bioconversions. In: *Biotechnology of Filamentous Fungi: Technology and Product* (Finkelstein D B and Ball C eds) 157~187. Butterworth-Heinemann, Stoneham

Holland H L, Bergen E J, Chenchaiah P C et al. 1987. Side chain hydroxylation of aromatic compounds by fungi. 1. Products and stereochemistry. *Can J Chem.*, 65: 502~507

Holland H L, Destefano D, Ozog J. 1994. Side chain hydroxylation of aromatic hydrocarbons by fungi. Part 6, Biotransformation of olefins by *Mortierella isbellina*. *Biocatalysis*, 10: 65~76

Inouye M, Takada Y, Muto N et al. 1994. Characterization and expression of a P450-like mycinamicin biosynthesis gene using a novel *Micronospora-Escherichia coli* shuttle cosmid vector. *Mol Gen Genet.*, 245: 456~464

Kapteyn J C, Pillmor J B, de Waard MA. 1992. Biochemical mechanisms involved in the selective fungitoxicity of two eburicol 14α-demethylation inhibitors, procloraz and an quinconazole: accumulation and metabolism studies. *Pestic. Sci.*, 36: 85~93

KarLson U, Dwyer D F, Hooper SW et al. 1993. Two independently regulated cytochrome P450 in a *Rhodococcus*

*rhodochrous* strain that degrades 2-ethoxyphenol and 4-methoxybenzoate, *J Bacteriol*, 175:1467~1474

Kawauchi H, Sasaki J, Adachi T et al. 1994. Cloning and nucleotide sequence of a bacterial cytochrome P450 VD25 gene encoding vitamin D-3,25-hydroxylase. *Biochem. Biophys. Acta*, 1219:179~183

Keller N P, Hohn T M. 1997. Metabolic pathway gene cluster in filamentous fungi. *Fungal Genet. Biol.*, 21:17~29

Keller N P, Segner S, Bhatnagar D et al. 1995. A putative P-450 monooxygenase is required for the conversion of versicolorin A to sterigmatocystin in *Aspergillus nidulans*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61:(10):3628~3832

Kizaw H, Tomura D, Oda M et al. 1991. Nucleotide sequence of the unexceptional nitrate/nitrite-inducible cytochrome P450 cDNA from *Fusarium oxysporum*. *J. Biol. Chem.*, 266(16):10632~10637

Kudo T, Tomura D, Liu D L et al. 1996. The isozymes of P450nor of *Cylindrocarpon tonkinense*: Molecular cloning of the cDNAs and genes, expression in the yeast and the putative NAD(P) H binding site. *Biochimic*, 78:792~799

Lambert M, Kremer S, Sterner O et al. 1994. Metabolism of pyrene by the basidiomycete *Crinipellis stipitaria* and identification of pyrene quinones and their hydroxylated precursors in strain JK374. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60(10):3597~3601

Lange B, Kremer S, Sterner O et al. 1994. Pyrene metabolism in *Crinipellis stipitaria*: identification of trans-4,5-dihydro-dihydroxypyrene and 1-pyrenesulfate in strain JK374. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60(10):3602~3607

Laumen L, Pinto L, Wiebe C et al. 1995. The oxidation of pyrene and benzo(a)pyrene by nonbasidiomycetes fungi. *Can J Microbiol.*, 41:477~488

Mahato S B, Majumdar I. 1993. Current trends in microbial steroid biotransformation. *Phytochemistry*, 34:883~898

Maloney AP, BanEtten H D. 1994. A gene from the *fungal* pathogen *Nectria haematococca* that encodes the phytoalexin detoxifying enzyme pisatin demethylase, defines a new cytochrome P450 family. *Mol. Gen. Genet.*, 243:506~514

Martinis S A, Ropp J D, Sligar SG et al. 1991. Molecular recognition by cytochrome P450cam: substrate specificity, catalysis and electron transfer. In *Microbial and Plant cytochromes P450: Biochem, Characteristics, Genetic Engineering and Practical Implications. Frontiers in Biotransformation*. Vol. 4. Ruckpaul, K., Rein, H. (eds). London: Taylor and Francis, 54~86

Miura Y, Fulco A J. 1974. (ω-2) hydroxylation of fatty acids by a soluble system from *Bacillus megaterium*. *J. Biol. Chem.*, 249:1880~1888

Morace G, Sanguinetti, M, Posteraro B et al. 1997. Identification of various medically important *Candida* species in clinical, specimens by PCR-restriction enzyme analysis. *J. Clin. Microbiol.*, 35:667~672

Munro A W, Lindsay J G. 1996. Bacterial cytochromes P450. *Molecular Microbiology*, 20(6):1115~1125

Nagy I, Schloof G, Compernolle F et al. 1995. Degradation of the thiocarbamate herbicide EPTC (S-ethyl dipropylcarbamothioate and biosafening by *Rhodococcus* sp. Strain N186/21 involve an inducible cytochrome P450 system and aldehyde dehydrogenase. *J Bacteriol*, 177:676~687

Nakahara K, Shou H. 1996. N-terminal processing and amino-acid sequence of two isoforms of nitric oxide reductase cytochrome P450nor from *Fusarium oxysporum*. *J. Biochem.*, 120:1082~1087

Nakayama N, Takemoto A, Shou H. 1996. Cytochrome P450 foxy a catalytically self-sufficient fatty acid hydroxylase of the fungus *Fusarium oxysporum*. *J. Biochem.*, 119:435~440

Narhi L O, Fulco A J. 1982. Phenobarbital induction of a soluble cytochrome P450 dependent fatty acid monooxygenase in *Bacillus megaterium*. *J. Biol. Chem.*, 257:2147~2150

Narhi L O, Fulco A J. 1987. Identification and characterization of two functional domains in cytochrome P450 BM-3, a catalytically self-sufficient monooxygenase induced by barbiturates in *Bacillus megaterium*. *J. Biol. Chem.*, 262:6683~6690

Narhi L O, Fulco A J. 1986. Characterization of a catalytically self sufficient 119,000 Dalton P450 monooxygenase induced by barbiturates in *Bacillus megaterium*. *J. Biol. Chem.*, 261:7160~7169

Narhi L O, Wen L P, Fulco A J. 1988. Characterization of the protein expressed in *Escherichia coli* by a recombinant plasmid containing the *Bacillus megaterium* cytochrome P450 BM-3 gene. *Mol Cell. J. Biol. Chem.*, 79:63~71

Nelson D R, Koymans L, Kamataki T et al. 1996. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession num-

bers, nomenclature. *Pharmacogenetics*, 6:1~42

O'Keefe D P, Harder P A. 1991. Occurrence and biological function of cytochrome P450 monooxygenases in the actinomycetes. *Mol Microbiol*, 5:2099~2105

Ohkuma M, Masuda Y, Park S M et al. 1995. Evidence that the expression of the gene for NADPH-cytochrome P450 reductase is N-alkane inducible in *Candida maltosa*. *Biotech. Biochem.*, 59(7):1328~1330

Pelkonen O, Nerbert D W. 1982. Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: Etiologic role in carcinogenesis. *Pharmacol. Rev*, 34:189~222

Peterson J A, Lorence M C, Amarnath B. 1990. Putidaredoxin reductase and putidaredoxin: cloning sequence determination and heterologous expression of the proteins. *J. Biol. Chem.*, 265:6066~6073

Pike S F, Shephard E A, Rabin B R et al. 1985. Induction of cytochrome P450 by phenobarbital is mediated at the level of transcription. *Biochem. Pharmacol.*, 34:2489~2494

Poulos T L, Finzel B C, Howard A J. 1987. High resolution structure of cytochrome P450 cam. *J. Mol. Biol.*, 195:687~700

Rauschenbach R, Isernhagen M, Noeske-Jungblut C et al. 1993. Cloning sequencing and expression of the gene for cytochrome P450meg, the steroid - 15 $\beta$  - monooxygenase from *Bacillus megaterium* ATCC 13368. *Mol. Gen. Genet.*, 241:170~176

Reimman C, VanEtten H D. 1994. Cloning and characterization of the PDA6-1 gene encoding a fungal cytochrome P450 which detoxifies the phytoalexin pisatin from garden pea. *Gene*, 146:221~226

Ropp J D, Gunsalus I C, Sligar S G. 1993. Cloning and expression of a new cytochrome P450lin (CYP111) from *Pseudomonas incognita*. *J. Bacteriol.*, 175:6028~6037

Rozman D, Komel R. 1992. Transformation of *Cochliobolus lunatus* with pUT720 changes the steroid hydroxylating ability of the fungus. *Curr Genet*, 22:123~127

Ruan Y, Straney D C. 1996. Identification of elements in the PDA1 promoter of *Nectria haematococca* necessary for a high level of transcription *in vitro*. *Mol. Gen. Genet.*, 250:29~38

Sagar S G, Murray R I. 1986. Cytochrome P450cam and other bacterial P450 enzymes. In *Cytochrome P450: Structure, Mechanism and Biochemistry*. Ortiz de Montellano PR, (ed). New York: Plenum Press, 429~503

Schager W, Straney D, Ciuffetti L et al. 1989. One enzyme makes a fungal pathogen, but not a saprophyte, virulent on a new host plant. *Science*, 246:247~249

Scheller U, Zimmer T K, Kargel E et al. 1996. Characterization of the  $\eta$ -alkane and fatty acid hydroxylating cytochrome P450 forms 52A3 and 52A4. *Arch. Biochem. Biophys.*, 328:245~254

Seghezzi W, Meili C, Ruffiner R, Kunzi R, Sanglard D, Fiechter A. 1992. Identification and characterization of additional members of the cytochrome P450 multigene family Cyp52 of *Candida tropicalis*. *DNA Cell Biol.*, 11(10):767~780

Seghezzi W, Sanglard D, Fiechter A. 1991. Characterization of a second alkane inducible cytochrome P450-encoding gene. Cyp52A2 from *Candida tropicalis*. *Gene*, 106:51~60

Shafiee A, Hutchinson C R. 1988. Purification and reconstitution of the electron transport components for a deoxyerythromycin B hydroxylase, a cytochrome P450 enzyme of macrolide antibiotic (erythromycin) biosynthesis. *J. Bacteriol.*, 170L:1548~1553

Shoun H, Tanimoto T. 1991. Denitrification by the fungus *Fusarium oxysporum* and involvement of cytochrome P450 in the respiratory nitrite reduction. *J. Biol. Chem.*, 266(17):11078~11082

Skaggs B A, Alexander J F, Pierson C A et al. 1996. Cloning and characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* C-22 sterol desaturase gene, encoding a second cytochrome P450 involved in ergosterol biosynthesis. *Gene*, 169:195~199

Sligar S G, Murray R I. 1986. Cytochrome P450-cam and other bacterial P-450. In *Cytochrome P450: Structure, Mechanism and Biochemistry*. Ortiz de Montellano PR (ed), New York: Plenum Press, 429~503

Straney D C, VanEtten H D. 1994. Characterization of the PDA1 promoter of *Nectria haematococca* and identification of a region that binds a pisatin-responsive DNA binding factor. *Mol. Plant-Microb. Interact.*, 7:256~266

Sutherland J B. 1992. Detoxification of polycyclic aromatic hydrocarbons by fungi. *J. Indian Microbiol.*, 9:53~62

Sutter T R, Sanglard D, Loper J C. 1990. Isolation and characterization of the alkane-inducible NADPH-cytochrome P450 oxi-

doreductase gene from *Candida tropicalis*. *J. Biol. Chem.*, 265(27):16428~16436

Trower M K, Sariaslani F S, O'Keefe DP. 1989. Purification and characterization of a soybean flour-induced cytochrome P450 from *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.*, 171:1781~1787

Tully R E, Keister D L. 1993. Cloning and mutagenesis of a cytochrome P450 locus from *Bradyrhizobium japonicum* that is expressed anaerobically and symbiotically. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59:4136~4142

Unger B P, Gunsalus I C, Sligar S G. 1986. Nucleotide sequence of the *Pseudomonas putida* cytochrome P450cam gene and its expression in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 261:1158~1163

van den Brink J M, Van Gorcom RFM, van den Hondel AMJJ, et al. 1998. Cytochrome P450 enzyme systems in Fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 23:1~17.

Van den Brink J M, Van Zeijl CMJ, Borns JF, et al. 1995. Cloning and characterization of the NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase gene from the filamentous fungus *Aspergillus niger*. *DNA Cell Biol.*, 14(8):719~729

Van den Brink J M, Van Nistelrooy JGM, De Waard M A, et al. 1996b. Increased resistance to 14 $\alpha$ -demethylase inhibitors (DMIs) in *Aspergillus niger* by coexpression of the *Penicillium italicum* eburicol 14 $\alpha$ -demethylase (*cyp51*) and the *Aspergillus niger* cytochrome P450 reductase genes. *J. Biotechnol.*, 49:13~18

Van den Brink J M, Van Zeijl CMJ, Brons J F, et al. 1996a. Optimization of the benzoate inducible benzoate  $\rho$ -hydroxylase cytochrome P450 enzyme system in *Aspergillus niger*. *App. Microbiol. Biotechnol.*, 46:360~364

Van Dyk M S, Kock JLF, Botha A. 1994. Hydroxy long-chain acids in fungi. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 10:495~504

Vander Bossche H. 1990. Importance and role of sterols in fungal membranes. In *Biochemistry of Cell Walls and Membranes in Fungi* (P J Kuhn, APJ Trinci, M J Jung, M W Goosey and L G Copping Eds.), PP135~158. Springer-Verlag, Berlin

VanEtten H D, Matthews D E, Matthews P S. 1989. Phytoalexin detoxification: Importance for pathogenicity and practical implications. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 27:143~164

Van Gorcom RFM, Boschloo J G, Kuijvenhoven A, et al. 1990. Isolation and molecular characterisation of the benzoate-para-hydroxylase gene(*bphA*) of *Aspergillus niger*. A member of a new gene family of the cytochrome P450 superfamily. *Mol. Gen. Genet.* 233:192~197

Vitas M, Rozman D, Komel R, Kelly S L. 1995. P450-mediated progesterone hydroxylation in *Cochliobolus lunatus*. *J. Biotechnol.*, 42:145~150

Weltring K M, Turgeon B G, Yoder O C, et al. 1988. Isolation of a phytoalexin-detoxification gene from the plant pathogenic fungus *Nectria haematococca* by detecting its expression in *Aspergillus nidulans*. *Gene*, 68:335~344

Wen L P, Ruettinger R T, Fulco A J. 1989. Requirement for a 1-kilobase 5'-flanking sequence for barbiturate-inducible expression of the cytochrome P450 BM-3 gene in *Bacillus megaterium*. *J. Biol. Chem.*, 264:10996~11003

Wunder T, Kremmer S, Sterner O, et al. 1994. Metabolism of the polycyclic aromatic hydrocarbon pyrene by *Aspergillus niger* S K 9317. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 42:636~641

## 第十章 细胞色素 P450 基因表达调控机制

P450 的催化活性取决于 P450 的含量水平, P450 含量受蛋白合成的各个阶段以及血红素与蛋白质结合形成全酶整个过程的影响(Gibson and Skett, 1994)(图 10.1)。酶的抑制以及翻译后修饰也会影响 P450 对底物的氧化作用(Murray, 1992; Jansson, 1993)。

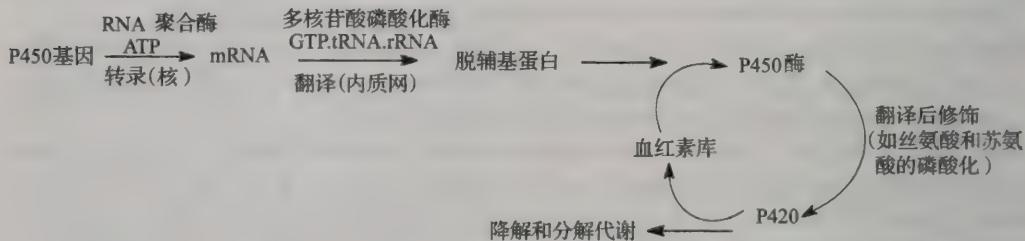


图 10.1 P450 基因表达调控的几个步骤(Lewis, 1996)

不同 P450 在生物体各组织器官的细胞中的调控方式现在知道的不多,如今蓬勃发展的分子生物技术可以进行基因分析和操纵,为这一领域的发展展示出广阔前景。但有一点是清楚的,细胞色素 P450 的诱导机制是多样的,许多诱导作用与相关 P450 基因本身的调控元件有关(Hines *et al.*, 1994; Tukey and Johnson, 1990; Omura *et al.*, 1993)。

P450 基因表达的调控受一系列因子的控制,如诱导剂的存在, P450 基因本身(操纵子)的状态。P450 基因的调控序列(regulatory segments)是变化的(Kemper, 1993)。即便是属相同基因家族或亚族的 P450 基因,其调控序列都有所不同。因此,一些关系密切的 P450 基因的表达与调控方式存在差异(如 CYP2B1 和 B2, CYP3A1 和 CYP3A2)。由于基因调控元件的不同,可能出现某些基因是组成型表达,某些基因可被诱导。不同器官和组织、不同性别、不同的发育阶段 P450 的表达可能不一致。天然激素和外源性化合物可以影响不同 P450 的含量(Gibson and Skett, 1994),这些因子可能直接或间接地与特定 P450 基因的调控区域发生相互作用。诱导剂与结合在 P450 基因调控元件的受体或阻遏蛋白(repressor protein)结合(Nebert *et al.*, 1991),如芳烃(aromatic hydrocarbon, AH)诱导剂与芳烃受体结合,再与芳烃受体核转运蛋白(AH receptor nuclear translocator, Arnt)因子结合,此结合物进入核内再与 P450 CYP1 基因的调控区域的一定元件(elements)结合,引发 P4501 从头合成(Hankinson, 1995)。诱导剂也可以通过与阻遏蛋白结合而影响诱导过程(通常阻遏蛋白结合在 P450 基因的操纵基因区域)(English *et al.*, 1994),阻遏蛋白被释放,基因结构区域的编码序列启动转录,苯巴比妥类型的诱导以及过氧化物酶体增殖因子(peroxisome proliferator)介导的诱导是以这种方式起作用,也即 P450 基因表达的调节通过反式作用调控因子对顺式作用的 DNA 响应元件(response elements)的效应来控制(Omura *et al.*, 1993)。除诱导外, P450 的催化活性可能因一些因子而降低,称为下调控(down-regulated)如抑制、低表达(poor expression)(由于遗传多态、等位变异或其他

因子)和翻译后修饰导致缺乏与血红素的亲和性而使 P450 蛋白失去功能(Jansson, 1993; Pyerin and Taniguchi, 1991)。值得注意的是,底物或诱导剂在浓度达到一定量时,可能起抑制剂的作用(Okey, 1990)。免疫特异性(immonspecific)抗体可能通过阻断 P450 与其氧化还原成分如还原酶或细胞色素  $b_5$  的相互作用而抑制 P450 的催化活性(Edwards *et al.*, 1991)。生物膜本身也有可能在 P450 的调控中起主要作用,蛋白激酶 C(protein kinase C)的调控受膜本身影响(Epand and Lester, 1990)。据报道细胞色素  $b_5$  可以通过竞争性结合到邻近的丝氨酸磷酸化位点的区域来抑制 P450 的磷酸化作用(Jansson *et al.*, 1990)。

P450 的磷酸化作用控制着 P450 的翻译后修饰,磷酸化作用使 P450 失去血红素而被降解(Oesch-Bartlomowicz and Oesch, 1990),随后 P450 变成失活型 P420(Correia, 1991)。磷酸化作用是由依赖 cAMP 的蛋白激酶 A(protein kinase A)介导的(Pyerin and Taniguchi, 1991; Jansson, 1993)。除细胞色素  $b_5$  外,一些诱导剂如乙醇、丙酮能保持某些 P450(如 CYP2E1)较高的水平,它们的作用是通过与邻近丝氨酸的氨基酸位点或丝氨酸结合,抑制蛋白激酶对 P450 的磷酸化作用,这通常被认为是 2E 基因诱导的可能机制(Coon *et al.*, 1992),这种诱导机制定名为蛋白质稳定作用。mRNA 的稳定也将导致 P450 的诱导(Porter and Coon, 1991; Waxman and Azarott, 1992)。

P450 基因的缺失(deletion)或突变可能导致 P450 催化活性的完全丧失或减少。P450 基因点突变和氨基酸残基的改变可能产生失活的或弱活性的酶(Daly and Idle, 1993)。人类 CYP2D 基因族的多态性产生“低代谢者”(poor-metabolizer)的生物型就是这一类型(Heim and Meyer, 1991; Price-Evans, 1993; Meyer, 1991)。生甾醇(steroiodogenic)的 P450 基因表达严格受激素的调控(Okey, 1990; Gibson and Skett, 1994),如促激素(trophic hormone)控制排卵周期(ovulation cycle),可以影响在月经期(menstrual period)的特定阶段相关生甾醇 P450 的水平(Jefcoate and McNamara, 1991)。促滤泡激素(follicle stimulating hormone, FSH)调控 CYP11A1 和 CYP19 含量,而促黄体激素(luteinizing hormone, LH)促进卵巢 CYP17 活性,FSH 和 LH 组合控制着月经循环特定时期的雌二醇(estriadiol)和黄体酮的产生。从胆固醇到雌二醇和黄体酮的合成中,CYP11A1, CYP17 和 CYP19 起了重要的催化作用,FSH 和 LH 含量的高峰刚好在排卵前,与雌二醇浓度的迅速增加同步。随后黄体酮的增加(排卵 7 天后)在下丘脑/垂体轴发挥负反馈作用机制,以降低 28 天循环中前 14 天的 FSH 和 LH 水平。但促激素(ACTH, FSH, LH 和 PTH)在精巢和卵巢等不同组织中为什么可以调控生甾醇 P450 的表达还不太清楚,有可能是通过调节不同甾醇激素(或它们的中间因子)与 P450 基因的响应元件的结合来实现,如性别特异的 P450 其表达是由生长激素调控的(Omura *et al.*, 1993)。

同一因子可能诱导几种 P450 酶的表达,这与真核基因的组织方式有关(Omura *et al.*, 1993)。编码不同酶的多个结构基因,可以以基因串(battery)或座(locus)的形式联接在一起,如 Ah 基因座(Nebert, 1989a; Nebert *et al.*, 1990, 1991)编码 CYP1A1 和 CYP1A2 以及另四个 II 相酶即 NADPH 甲萘醌氧化还原酶(Nmo-1)、醛脱氢酶(Aldh-1)、UDP-葡萄糖苷酸(基)转移酶(Ugt-1)和谷胱甘肽转移酶(Gt-1)。诱导剂与 Ah 受体结合后转移到核中,再与 Ah 基因串的有关调控元件相互作用,不仅引发 CYP1A1 的合成而且引发 CYP1A2 以及 II 相酶的合成(Nebert *et al.*, 1990)。这些 II 相酶可以进一步处

理生物体中由 CYPP450 介导反应的产物,与 P450 在功能上相协调。另一例子是 P450 的诱导可能与其还原酶有共同的调控机制,如苯巴比妥、地塞米松(抗炎药, dexamethasone)、孕烯醇酮-16 $\alpha$ -腈(PCN)、丙酮、乙醇、DDT 和利福平除诱导多种 P450 外,还诱导 NADPH-细胞色素 P450 氧化还原酶(Shen and Kasper, 1993)。

这些所谓的串联(tandem)基因在生物体的不同组织的排列可能彼此不同,这可能是这些基因在不同组织中表达存在差异的原因(Kemper, 1993; Hines *et al.*, 1994),如发生 DNA 修饰的组织(例如,在一个基因串中某一结构基因的缺失或修饰,某一调控元件的变异)就可能产生一低活性或无活性的特定 P450。不同组织中基因串存在差异可以解释性别双态现象(sexual dimorphism)如小鼠肾和肝中的 CYP2A4 和 CYP2A5 在不同性别中的差异表达;当然,激素的差异也可能是性别双态现象的原因(Ryan and Levin, 1993)。因此, P450 介导的化合物的代谢表现出的组织、性和种类差异是 P450 同工酶具有不同的表达或调控机制的结果(Padmanaban and Nirodi, 1994; Hines *et al.*, 1994)。不同 P450 的表达可能协同调控,但可能具有组织特异性,这取决于激素及其他因子对调控方式的影响。

表 10.1 组成型 P450 的内源性调控因子(Okey, 1990; Gibson and Skett, 1994)

P450	组织	激素型诱导剂/调控因子	P450	组织	激素型诱导剂/调控因子
CYP11A1	肾上腺	ACTH	CYP17A1	卵巢	LH
CYP11B1	肾上腺	ACTH	CYP19A1	卵巢	FSH
CYP17A1	肾上腺	ACTH	CYP11A1	精巢	LH
CYP21B1	肾上腺	ACTH	CYP17A1	莱迪希氏细胞	LH
CYP11A1	卵巢	FSH	CYP27	肾	PTH

注:ACTH: adrenocorticotropic hormone 促肾上腺皮质激素,LH: lutenizing hormone 促黄体激素 FSH: follicle stimulating hormone 促滤泡激素, PTH: parathyroid hormone 甲状腺激素。

表 10.2 诱导剂对 P450 及 NADPH-细胞色素 P450 还原酶的协同诱导作用(Shen and Kasper, 1993)

诱导剂	诱导倍数(处理/对照)		诱导剂	诱导倍数(处理/对照)	
	还原酶	P450		还原酶	P450
苯巴比妥	1.8	57 (2B1)	丙酮	1.4	1.6
R-芪氧化物	1.6	38 (2B1)	乙醇	1.2	1.4
DDT	8.9	1.2	PCN	1.2	1.4 (3A1)
TCDD	1.3	2	地塞米松	1.5	4 (3A1)
3MC	1.3	49 (1A2)	DEHP	1.5	3
$\beta$ NF	1.0	23 (1A1)	DHEA	1.8	17 (4A1)
2-AAF	1.2	1.0			

注:DHEA: 二氢表雄甾酮(dihydroepiandrosterone), DDT: p,p-dichlorodiphenyl trichloroethane, TCDD: 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, 3MC: 3-甲基胆蒽(3-methylcholanthrene),  $\beta$ NF:  $\beta$ -萘黄酮( $\beta$ -naphthoflavone), 2-AAF: 2-乙酰氨基芴(2-acetylaminoflurene), PCN: 孕烯酮-16 $\alpha$ -腈, DEPH: 二-(2-乙基己基)邻苯二甲酸酯(di-(2-ethylhexyl) phthalate)。

## 10.1 细胞色素 P450 基因的诱导与调控

### 10.1.1 P450 基因诱导机制的多样性

P450 基因表达经历图 10.1 的几个阶段。真核生物产生特异的 mRNA 还需进一步加工以去除(剪接)非编码区(外显子)以产生具有翻译活性的 mRNA, mRNA 经翻译形成脱辅基 P450 蛋白。

P450 诱导可能在 P450 基因表达的各阶段都发生, 诱导表现出不同的机制。某些诱导机制如转录活化可能比其他机制更普遍(见第一章)。通常情况下, 一类诱导剂表现特定的诱导作用, 即便是同一个 P450 和诱导剂, 也有可能不止一种机制起作用。

### 10.1.2 P450 基因的调控元件

在 P450 基因中存在一些不同的调控元件(图 10.2)。这些元件可以控制蛋白质的表达, 或者通过转录活化或转录阻遏, 取决于元件的功能和结合因子的性质(Omura *et al.*, 1993)。这些元件的排列可能在不同的 P450 会有所不同, 而且启动子和阻遏蛋白的结合也受许多因素的影响, 包括细胞类型、性别、年龄(Horbach *et al.*, 1992)以及生物体的发育状况(Hines *et al.*, 1994)。

调控因子的结合可能改变 DNA 序列中的某一段如响应元件的几何形状, 增加 DNA 的曲度, 由此导致远离片段间在立体空间上靠近而发生相互作用(Hines *et al.*, 1994)。因此 5'-侧翼区的某部分的结合可能调节基因调控部位的效应。调控元件通常位于转录启动位点的上游区, 有人研究发现响应元件可能位于第一外显子区(Hines *et al.*, 1994)。因此远距离的调控也可能导致 P450 的诱导。

许多调控因子与响应元件相互作用可以产生活化或阻遏效应, 如 TCDD 与胞质 Ah 受体结合导致 CYP1A1 基因的转录活化(Reyes *et al.*, 1992; Burbach *et al.*, 1992; Hankinson, 1995)。某些诱导剂的响应元件如异生素响应元件(xenobiotic, XRE)和糖皮质激素(glucocorticoid)响应元件(GRE)、雌激素(estrogen)响应元件(ERE)可能存在于不同的 P450 基因中(Kemper, 1993), 这些元件与诱导剂的诱导作用相关。PB 类型的诱导是通过配体与阻遏蛋白或其他蛋白结合, 然后释放这些蛋白, 由此产生转录活性。几个响应元件可能存在于同一基因, 这可以解释某一 P450 可以被不同的诱导剂诱导。

P450 基因的调控区既有相同又有不同, 这在理论上解释了不同种、性别和组织中 P450 调控的变异。如生甾醇 P450 的基因(CYP1A1、11B1、17、19、及 21), 在它们的调控区都具有响应元件(CRE), 这些响应元件通过一个特异性结合蛋白与 cAMP-介导的调控相联系(Kemper, 1993)。已知所有这 5 种 P450, 它们的含量受到 cAMP 的调控。分析这 5 种 P450 基因序列发现, 所有基因其 5'-侧翼区具有 TATA 盒(位于转录启动位点的上游 20~40bp 之间), 在 TATA 盒的上游 20 或以上碱基对处有一基础转录元件(basal transcription element, BTE), 在 BTE 区通常包含 CAAT 盒(如肝特异性 P450)和一个 GC 盒。而在可被苯巴比妥诱导的基因 CYP2B1 和 CYP2B2 以及 CYP102、CYP106 基因的

BTE 区域存在一特异性 17bp 的序列,称为 Barbie 盒(Padmanaban and Nirodi, 1994; Fulco, 1991)。组织特异性元件(如那些可以与肝细胞核因子结合的元件)可以在 RNA 转录位点上游 40~200bp 之间存在,更常见于转录起始位点上游的 -80~ -120bp 处(Kemper, 1993)。在组织特异性因子调控元件的更上游通常可以发现一些糖皮质激素响应元件(GREs),这是某些 P450 可被糖皮质激素诱导的原因。比较特别的是 CYP1A1 基因,其 GRE 存在于第一个外显子上(Hines *et al.*, 1994)。在启动子位点(BTE 和 TATA)和大约 -200bp 处,生甾醇 P450 也可能包含 CRE,家族 2 和 3 的 P450 包含异生素响应元件(XREs),而 CYP1 家族基因的 XRE 大致在启动位点的 -500 和 -3500bp 之间(Hines *et al.*, 1994)。

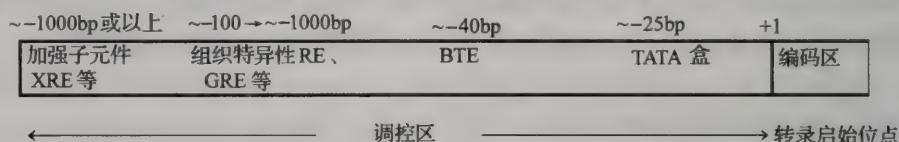


图 10.2 P450 基因的简化结构

以上讨论的响应元件的位置和数量因不同 P450 家族(或亚家族)而不同,有时同一亚家族的 P450 其响应元件的位置和数量也不一致。研究得最为清楚的调控区是 CYP1A1 基因(Kemper, 1993)。大鼠 CYP1A1 有 5 个 XRE(-3586, -1233, -1089, -1010, -537bp),其中 -1000 至 -1100bp 之间的两个 XRE 组成了喜 Ah 受体结合位点。这 5 个 XRE 中,包含一个核心序列 CACGC,为 17bp 同源序列的一部分(homologous sequence)(Omura *et al.*, 1993; Hines *et al.*, 1994)。CYP1A2 的调节区与 CYP1A1 有所不同,例如,在 1A2 基因中有较多的 HNF-REs(1A1 中只有 1 个),1A1 有 5 个 AhR 响应元件存在于 5'-侧翼区(而 1A2 只有一个)(Hines *et al.*, 1994)。这表明 1A2 更可能在肝中表达,1A1 更容易被 1A 的诱导剂所诱导(Gonzalez and Gelboin, 1994; Omura *et al.*, 1993)。通过分析 P450 基因的调控区,可以获取许多有用的信息,如在 2B1/2 和 CYP102 调控区发现存在共有的核苷酸序列(Barbie 盒),这些基因都有可被苯巴比妥诱导的这一共同性质(Kemper, 1993)。

### 10.1.3 诱导剂的结构与诱导机制的关系

从 P450 诱导剂结构上的差异可以判断 P450 的诱导机制可能有所不同。例如, CYP1 的诱导剂都与 Ah 受体结合,在分子结构上具有显著的相似性,如 TCDD 表现一定的平面性和一定程度矩形结构(Landers and Bunce, 1992)。PB-类型诱导剂如 CYP2B 诱导剂,虽然大多数具有非平面和 V-型分子构象,但诱导剂之间结构的相似性却并不明显。

CYP2E 诱导剂的特征是相对较小、结构多样的分子(Lewis *et al.*, 1994a),其中有一些通过与丝氨酸结合,具有稳定蛋白质以免被降解的作用。这种诱导剂至少需要一个负电性原子以便与丝氨酸形成氢键,从而阻止丝氨酸的磷酸化这一翻译后修饰作用,乙醇、

丙酮、乙醚是典型的 CYP2E 诱导剂。

可以诱导 CYP3A 的化合物包括内源性和合成的甾醇(Okey, 1990; Waxman *et al.*, 1985), 由此认为与 DNA 结合的甾醇激素受体, 如糖皮质激素受体可能介导 CYP3 的诱导(Wright and Paine, 1994)。在 CYP3 基因的 5'-侧翼区存在甾醇受体响应元件(GRE 和 ERE)(Kemper, 1993)支持了甾醇受体介导 CYP3 诱导这一假说。

CYP4 的诱导与过氧化物酶体的增殖相关(Gibson, 1992; Hardwick, 1991), 过氧化物酶体增殖是啮齿动物致癌作用的重要特征(Lake, 1995)。过氧化物酶体增殖因子活化受体(peroxisome proliferator-activated receptor, ppar)被鉴定是 CYP4 诱导和过氧化物酶体增殖的介导因子, ppar 这一受体蛋白属于甾醇激素受体超家族。因此, 存在于有关基因调控区域中的 ppar-结合响应元件, 可能同时调控两个过程即 CYP4 蛋白和过氧化物酶体增殖酶的合成。这种诱导机制不同于 CYP1 的诱导, 过氧化物酶增殖因子是通过取代与 ppar 结合的内源性配体, 也不是通过结合在 ppar 上而起作用。对于后者(CYP1), 配体与 Ah 受体的结合亲和性与 CYP1 的诱导密切相关(Denomme *et al.*, 1985; Golas *et al.*, 1990)。

表 10.3 P450 诱导剂 (Lewis, 1996)

CYP1A	CYP2B	CYP3A	CYP4A
1. 多环芳烃(如 3MC, BP, BA 和 DBA)	1. 苯巴比妥及相关的巴比妥类	1. 乙醇	1. 孕烯醇酮 16 $\alpha$ -腈
2. 吩噻嗪	2. 二苯乙内酰脲和其他的乙内酰脲	2. 苯	2. 地塞米松
3. $\beta$ -萘黄酮	3. DDT	3. 异丙醇	3. 安体舒通(spirolactone)
4. 植物吲哚	4. 1,4-双[2-(3,5-二氯-吡啶基氧)]苯	4. 吲哚	4. 红霉素(erythromycin)
5. 吲哚并咔唑	5. 八氯苯乙烯	5. 丙酮	5. 利福平(rifampicin)
6. 玫瑰树碱	6. 反-芪氧化物	6. 乙醚	6. 三乙酰夹竹桃霉素(triacetyloloandomycin)
7. TCDD	7. 五甲基苯	7. 三氯乙烷	7. 克霉唑(clotrimazole)
8. 卤代二苯呋喃	8. 多氯联苯	8. 吡唑	8. 酮康唑(ketoconazole)
9. 多氯联苯	9. 狄氏剂	9. 异烟肼	9. 内源性糖皮质类固醇(如可的松, 皮质醇)
10. 多溴联苯		10. 糖尿病	10. 苯巴比妥
11. 2-乙酰氨基芴		11. 饥饿	
12. 烟草			
13. 原油			
14. 苯并香豆素			

注: 3MC: 3-甲基胆蒽; PB: 苯并芘; BA: 苯并蒽。

DBA: 二苯基蒽; TCDD: 2,3,7,8-四氯二苯- $\rho$ -二氯芑。

DDT:  $\rho$ , $\rho$ -二氯二苯基-三氯乙烷。

### 10.1.4 P450 基因诱导调控模型

哺乳动物包含至少 17 不同 P450 基因家族, 编码大约 50~60 种 P450 (Nelson, 1999)。CYP1~4 家族编码肝中表达的酶, 代谢外源化合物(药物、环境化合物、其他异生素类)以及内源性亲脂物质。这些基因在不同层次以不同方式调节, 表现出组织特异性, 可被内源性激素和细胞因子调节, 结构歧异的外来化合物可以促进 P450 基因转录启动, 升高 P450 蛋白的含量。这种 P450 的诱导应答对于依赖 P450 的药物代谢、药物动力学, 药物-药物相互作用, 对外源化合物的毒性与致癌性以及对内源性激素的代谢都有重要的影响(Conney, 1982)。其他 13 个基因家族(CYP 5, 7, 8, 11, 17, 19, 21, 24, 26, 27, 39, 46, 和 51)不代谢外源物质, 而是以重要的内源性生理物质为底物; CYP5 和 8 对血栓素和前列环素生物合成有重要作用; CYP11, 17, 19 和 21 催化从胆固醇到甾醇激素所需的羟基化反应; CYP7, 24, 27 和 51 催化胆汁酸, 活化维生素 D3 和胆固醇生物合成所需的羟基化作用; CYP26 催化视黄酸的羟基化。这些生物合成 P450 也以组织特异性方式, 受内源性激素和其他因子的调控。

许多 CYP1~4 家族的 P450 基因可被外源化合物转录活化, 通过 4 种依赖受体的机制的某一种诱导 P450 基因的表达。特异性外源物质受体蛋白在基因诱导中发挥关键作用(表 10.4)。

表 10.4 核受体介导的 P450 诱导

P450 诱导剂	典型响应的大鼠肝 P450	受体
多环芳烃	1A1, 1A2, 1B1	Ah 受体*
苯巴比妥	2B1, 2B2	CAR
地塞米松	3A1, 3A2, 3A23	PXR
Fibrate 药物	4A1, 4A2, 4A3	PPAR $\alpha$
胆固醇	7A1	LXR $\alpha$
胆汁酸	7A1	FXR
甲状腺激素	P450 还原酶	TR

\* 为 PAS 转录因子家族成员, 不是核受体。CAR 等的全称见表 10.5。

#### 10.1.4.1 Ah 受体与 CYP1 的诱导

Ah 受体是转录因子中的 PAS 家族(图 10.3), 是一种螺旋-环-螺旋蛋白(Sogawa and Fujii-kuriyama, 1997), 它促进 CYP1 基因的表达。在胞液中芳烃配体与 Ah 受体结合, Ah 受体被活化; 活化的受体转移到核中, 与核因子 Arnt 形成杂二聚体, 再与 DNA 增强子序列(异生素响应元件, XRE)结合, 促进靶基因的转录。在许多细胞类型和不同种间, 以上过程是保守的, 代表了多环芳烃对 CYP1 基因的诱导机制。

CYP1A1 的转录活化是通过配体结合的 Ah 受体(Nebert, 1989a; Nebert and Gonzalez, 1985; Nebert *et al.*, 1990; Lin *et al.*, 1991; Fujii-Kuriyama *et al.*, 1989)。强诱导剂如二噁英(TCDD)将胞液 Ah 受体上的 90kDa 热休克蛋白(HSP90)置换下来, 这一受体

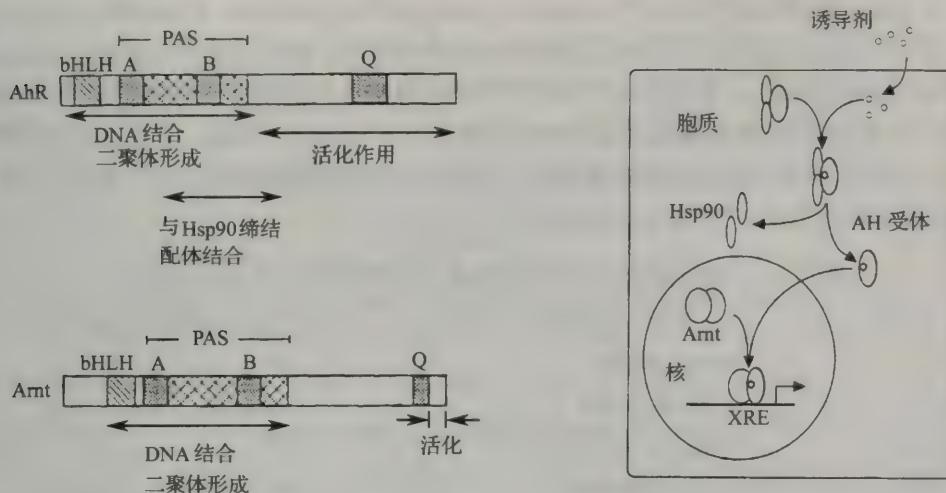


图 10.3 AhR 与 Arnt 的结构(左)及 Ah 受体介导的 P450 诱导作用示意图

(Sogawa and Fujii-kunyama, 1997)

再与另一蛋白结合(即 Ah 受体核转运因子, Ah receptor-nuclear translocation factor, Arnt),此复合物从胞液中转移到核中,再与 CYP1A 的调控区特定部位结合,其中 XRE1 和 XRE2 位点起重要作用(Ormura *et al.*, 1993)。

CYP1A1 与 Ah 受体复合物结合后,可以使 CYP1A1 的构象发生弯曲的变化,这样在直线上远离的片段可以靠近(Nebert, 1989b)。伴随 Ah/Arnt 复合体这种异质二聚体(heterodimer)的结合后 DNA 构象的变化可能导致双螺旋部分解链(Richard-Foy, 1994),在与基础转录元件(BTE)结合的阻遏蛋白释放后,于启动位点暴露出 DNA 碱基,由 RNA 聚合酶Ⅱ催化转录(Hankinson, 1995)。要触发 BTE 结合蛋白(BTEB)释放,要求 DNA 在 5'-侧翼区有一定的弯曲(curvature),异质二聚体与 XRE 结合引起的构象变化可以向下游传递到 BTE(-43bp)。

BTEB 的序列分析表明,BTEB 中与 DNA 结合的特征序列(motif)可能是“锌-指”结构(Fujii-Kuriyama *et al.*, 1992),这种“螺旋-转角-螺旋”(helix-turn-helix)结构作为 DNA 结合特征序列在其他蛋白中也很普遍,螺旋结构可以填入 DNA 双螺旋的大沟中(major groove)。可以推断 DNA 的某一段序列包含一个共同的核心(CAGCG),位于双螺旋的大沟中(Kemper, 1993)。配体结合在某特定受体(如 Ah 受体)改变了蛋白的构象,使 DNA 的响应元件与蛋白的 DNA 结合区更有可能发生相互作用。受体的 DNA 结合特征序列和配体结合域在顺序上可能距离较远,但多肽链被配体诱导产生折叠可以把这些序列拉近(Lewis *et al.*, 1995e)。

#### 10.1.4.2 “孤儿受体”机制

与 CYP1 基因的诱导不同,另三种生物异源物质的诱导机制涉及三种不同的“孤儿受体”(orphan receptors, 即其内源性、生理配体还不清楚的受体)。这些“孤儿受体”属于核受体/甾醇受体超家族。核 CAR 受体是近期发现的,介导苯巴比妥(PB)和许多其他“PB 样”的亲脂化合物对 CYP2B 的诱导作用(Waxman and Azaroff, 1992)。PXR(又称

PAR 和 SXR) 是孕烷核受体, 对于不同的化合物包括某些天然和合成的甾醇的作用产生应答, 活化 CYP3A 基因。第三类是过氧化物酶体增殖因子活化受体 (peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR) 可以介导 CYP4A 家族中脂肪酸羟化酶的诱导, 许多诱导剂属于“非基因毒性”致癌物和过氧化物酶体增殖因子的酸性化合物。所有这三类受体在肝中高度表达, 并对内源性配体产生应答。这些受体的内源性配体的发现 (表 10.5) 支持了这些受体在调节肝 CYP 表达中的作用。

表 10.5 P450 的核受体: 内源性配体及 DNA 响应元件 (Waxman, 1999)

核受体	代表性内源性配体	以 AGGTCA 为基础的 DNA 响应元件
CAR	雄烷醇, 雄烯醇	DR4
PXR	孕烯醇酮, 皮质酮	DR3, ER6
PPAR	亚油酸, 花生四烯酸	DR1
LXR	24(S)-羟基胆固醇	DR4
FXR	鹅脱氧胆酸	IR1
TR	甲状腺激素	DR4

注: Ah: aryl hydrocarbon (芳烃), CAR: 组成型雄烷受体 (constitutive androstan receptor)。

PXR: 孕烷 X 受体 (pregnane X receptor); LXR: 肝 X 受体 (liver X receptor)。

PPAR: 过氧化物酶体增殖因子活化受体 (peroxisome proliferator-activated receptor)。

FXR: 法尼醇 X 受体 (farnesol X receptor); TR: 甲状腺激素受体 (thyroid hormone receptor)。

另外两个核受体 LXR 和 FXR, 可以分别被氧甾醇类 (oxysterol) 和胆汁酸活化, 它们对肝 P450 的表达也起着重要作用—调控胆甾醇  $7\alpha$ -羟化酶, 该酶为胆汁酸生物合成过程中的关键酶。

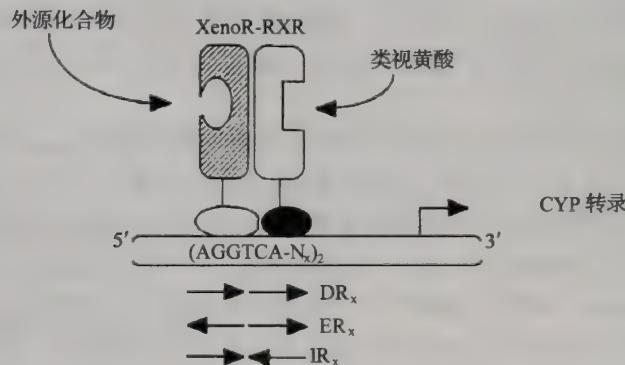


图 10.4 核受体在 CYP 基因诱导中的作用

注: Xeno R 异生素受体; RXR: 类视黄酸 X-受体; AGGTCA: 六聚体重复; DR<sub>x</sub>, ER<sub>x</sub>, IR<sub>x</sub>: 表示六聚体重复的核苷酸排列方向如箭头所示  
(Waxman, 1999)

上述 5 种 P450 调控的核受体属于相同的核受体基因家族 (NR1), 共享一个共同的杂二聚体配体即类视黄酸 X-受体 (RXR), 易于与其他核受体及其他胞间信号途径进行交谈式相互作用 (cross-talk interactions) (图 10.5), 包括被一定细胞因子和生长因子活

化。这些核受体各自的内源性配体已被鉴定,其生理受体功能渐渐得到阐明。由此推断,这些受体主要起调节肝 P450 活性的作用,以响应内源性化合物或激素的刺激。因此 P450 被异生素诱导在某些情况下可能导致内源性调节途径的紊乱,由此带来病生理学的后果。



图 10.5 CYP 基因诱导:外源化合物与内源化合物调控途径的相互作用(Waxman, 1999)

### 10.1.5 诱导引起 P450 的半衰期变化

P450 的诱导通常可以增加 P450 的半衰期(Correia, 1991)。在某种程度上,蛋白的转换取决于其 N-末端氨基酸的性质。在大多数 P450 的 N-末端残基中存在甲硫氨酸,这可能是诱导产生的蛋白有较长半衰期的一个原因。

诱导增加 P450 的半衰期可能的另一机制是改变 P450 的转换率(Jansson, 1993)。P450 转换受 cAMP 调控的磷酸化作用控制,P450 变性后失去血红素变成 P420,再被降解(Jansson *et al.*, 1990)。诱导剂与 P450 结合可能通过蛋白激酶介导的磷酸化作用途径阻断 P450 的降解(Jansson, 1993)。

表 10.6 P450 的半衰期(小时)(Correia, 1991)

P450	基础蛋白	诱导的蛋白	诱导剂
1A1	15	20, 38	PB, arochlor 1254
1A2	10	12, 22	PB, $\beta$ NF
2A1	14	20, 21	PB, $\beta$ NF
2B1, 2	19	37, 20	PB, $\beta$ NF
2C6	20	35	PB,
2C11	20	32	PB
3A1		14	DEX
3A2	12	27, 15	PB, $\beta$ NF

### 10.1.6 P450 诱导的实际后果

从实际的角度,P450 的诱导可以①改变治疗剂的功效,②导致生物体对药物或环境

化合物的“毒化”和“解毒”的失衡。

#### 10.1.6.1 P450 诱导引起的治疗剂功效的改变

一些药物既是 P450 诱导剂, 同时还是它自身诱导产生的 P450 的底物, 因此诱导剂可以促进它们自身的代谢, 这样就降低了药物的药效时间和强度。

许多异生素促进的不仅是它们自身的代谢, 还促进其他化合物的代谢与清除, 如人施用苯巴比妥增强了一些其他药物如安替比林、苯妥英(phenytoin)、口服避孕药和华法林(warfarin)的清除速率(Park and Breckenridge, 1981)。在大多数情况下, P450 诱导引起的药物相互作用具有较低程度的临床意义, 但如药物具有低的治疗指数(therapeutic index), 诱导可能严重抵消其功效而可能导致致命的后果。一个广为人知的例子是病人在进行抗凝血治疗过程中接受苯巴比妥, 其血浆中的华法林含量降低, 但经几天或几星期苯巴比妥处理后, 华法林剂量需要增加以保持达到其治疗功效的水平, 如果中断施用苯巴比妥, 由于“诱导”的 P450 活性降低到“正常”的水平, 因此华法林的代谢降低, 这样可能使血浆华法林的含量高, 导致致命性出血(Goldberg, 1980; Park and Breckenridge, 1981)。

#### 10.1.6.2 P450 诱导与药物和环境化合物的毒性

P450 诱导在生物异生素的毒性中发挥着复杂作用。一些 P450 可以将相对无反应性的母体化合物转化为具化学反应性的中间物, 产生的中间物具有毒性或致癌性(carcinogenic)。但是 P450 的诱导也可能加速有毒外源物质的失活和清除。因此, P450 诱导并非普遍有益, 也非总是有害。P450 诱导的益害的确定需要考虑许多因子, 包括: ①靶标(器官)或生物化学体系, ②生物异生素的性质, ③某种外源物质可以诱导何种 P450, ④相对于施用的底物, 诱导剂服用的时间, ⑤生物异源底物的施用方法。

##### (1) 肝毒性

肝是生物异生素代谢的主要部位, 它也是反应性中间物毒性的主要靶标。如大剂量的扑热息痛(acetaminophen)作用于肝, 可以产生严重甚至致命的肝坏死(Mitchell *et al.*, 1984)。如用苯巴比妥样(phenobarbital-like)诱导剂和用“MC-型”诱导剂预处理肝, 则毒性加强(Mitchell *et al.*, 1984), 药物代谢酶的诱导表现为不良的反应。

用苯巴比妥预处理啮齿动物, 可以加强溴化苯和四氯化碳的肝毒性(Mitchell *et al.*, 1984)。但将经 MC 预处理后的啮齿类动物暴露于溴化苯和四氯化碳时, 可免于肝毒性(Conney, 1982; Mitchell *et al.*, 1984)。苯巴比妥和 MC 都增加溴化苯的环氧化物的形成, 但 MC 处理的动物以 2,3-环氧化物占优势表现出良性反应, 而苯巴比妥处理动物产生 3,4-环氧化物可以破坏肝中的关键细胞成分(Mitchell *et al.*, 1984), 这个例子说明酶诱导的利或弊取决于诱导剂的性质, 也取决于底物的性质。

##### (2) P450 诱导与癌症的关系

一些 P450 在致癌物代谢中起关键作用, 或者活化前致癌物(precarcinogens)成致癌型, 或者使某些致癌物质解毒(Conney, 1982; Guengerich, 1988)。P450 可被 MC-型化合物、PB-类化合物、乙醇或异黄樟素诱导, 所有这些诱导的 P450 可以活化一个或多个前致癌物转换成能致癌的分子型(Guengerich, 1988)。例如, 乙醇诱导大鼠的 P450<sub>j</sub> 具有高的 N-亚硝基二甲胺脱甲基作用, 因此产生致癌物(Ryan *et al.*, 1988), 芳基胺和氨基联

苯对 P450 1A2 的诱导性与癌症的诱发有关(Nebert, 1988b)。

有关 P450 在癌症中作用的大多数研究是针对致癌作用的过程,但要注意的是,诱导的 P450 在决定病人对用于癌症化疗药物的反应起重要作用,如广为使用的抗肿瘤(anti-neoplastic)剂环磷酰胺需要代谢活化以发挥其治疗效果。大鼠用苯巴比妥预处理可以提高某些环磷酰胺活化的致癌中间物的量,而用 MC -型诱导剂,β-萘黄酮降低环磷酰胺的活化(Halses and Jain, 1980)。因此,P450 活性的操纵可以用于临床以达到最好的治疗功效,使副作用降为最低。P450 可诱导性的改变可能在许多肿瘤对传统化疗药物的抗性中起作用。如在对阿霉素(adriamycin)细胞毒性产生抗性的乳腺癌细胞系中,TCDD 不再诱导芳烃羟基化(AHH)活性(Moscow and Cowan, 1988)。一个类似的现象发现于大鼠肝经致癌物二乙基亚硝胺和 2 -乙酰氨基芴(acetylaminofluorene)诱导的前肿瘤小结(prenoeplastic nodules),这些小结对许多化合物的细胞毒性产生了高抗性,且抗性伴随着细胞色素 P450 含量的降低(Cameron *et al.*, 1976)。在抗性肿瘤细胞和前肿瘤小结中 P450 含量和 P450 可诱导性的降低可能是肿瘤细胞抗细胞毒剂的机制的一个部分(Fairchild *et al.*, 1987; Moscow and Cowan, 1988)。以下以 CYP1A1 为例说明癌症与诱导的关系。

P450 1A1 表现出 AHH 的高活性,它可以被 3 - MC 型化合物所诱导。AHH 将前致癌物如苯并吡转化为具有化学反应性的中间物。多环芳烃的二醇环氧化物具有很高的毒性和致变性,可以通过与关键 DNA 位点共价结合而致癌(Conney, 1982)。

AHH 诱导是由 Ah 受体介导的。近交小鼠的“敏感”品系含有一高亲和性型的 Ah 受体,当用 3 -甲基胆蒽(MC),苯并芘(BP)或苯并蒽(BA)处理时,几个组织都表现出高的可诱导性。而含低亲和性的 Ah 受体的小鼠在用 MC 或其他未卤代的多环芳烃处理时,不表现明显的 AHH 诱导作用(Eisen *et al.*, 1983)。“敏感”小鼠在 PAH 毒性和致癌的敏感性也不同于不敏感小鼠。“敏感”小鼠比“非敏感”小鼠在经皮下注射 MC 或 BP 诱导剂后对纤维肉瘤(fibrosarcomas)敏感(Nebert and Negishi, 1984),经气管内(intratracheal)滴注 MC 或 BP,易患肺癌肿瘤。另一方面,“不敏感”小鼠比“敏感”小鼠在经腹膜内注射 7,12 -二甲基苯基蒽易患淋巴肉瘤(lymphosarcomas),经皮下注射 3MC 诱导易患白血病(leukemias),经口服苯并芘诱导易患白血病(Nebert and Negishi, 1984)。由此可见,“敏感”小鼠(AHH 高可诱导性)比“非敏感”小鼠在经多环芳烃诱导后,对某些肿瘤敏感而对另一些恶性肿瘤不敏感。这些现象表明给药途径在决定 P450 诱导对生物体好或坏方面的重要性,也表明暴露在抗生素的生物体其遗传学特征的重要性。具 AHH 高诱导性的“敏感”小鼠,在前致癌物与组织更直接接触的情况下,具有更大的致癌风险。相反“非敏感”小鼠,远离前致癌物给药部位的靶标位点肿瘤发生的风险更大(Nebert and Negishi, 1984; Okey *et al.*, 1986)。如果前致癌物如 BP 口服或经皮下注射入“敏感”小鼠,BP 快速诱导肝中高水平的 AHH 活性,诱导的 AHH 活性可以有效地代谢 BP,肝的这一作用降低了前致癌物向其周边组织如肺、皮肤或骨髓传送,因此降低了这些组织致癌作用的风险。“非敏感”小鼠的基础肝 AHH 活性低,经 BP 作用后,活性无明显上升,因此肝不能有效地清除 BP。由于肝脏“第一步清理”作用不力,使 BP 通过血液循环传递到周边组织。如果前致癌物直接用于肿瘤敏感的组织如肺或皮肤,AHH 的高度诱导意义不大,因为 AHH 的活性可以有效地将前致癌物转变为致癌反应性中间物,这些中间物在这些组织中不容易被结合和分泌(不如肝脏)。从以上例子可以看出,诱导作用的好坏,不能简单地下

结论。

## 10.2 细胞色素 P450 的抑制

已知 P450 具有许多的抑制剂,其中有些是 P450 同工酶特异的。P450 酶被抑制的机制有几种,可以将 P450 的抑制剂分为几种特定类型。

### 10.2.1 竞争性抑制剂

与 P450 竞争分子氧或底物的抑制剂,这类抑制剂可与血红素铁或 P450 的活性位点结合,如 CO 可与氧竞争与血红素的结合,类似的分子包括 NO, CN<sup>-</sup> 和异氰化物 (Hill *et al.*, 1970a),这些小分子配体是强的  $\pi$ -受体。除以上小分子外,还有许多有机 P450 抑制剂,它们可以连结血红素分子,但本身也是 P450 的底物,这些有机配体都含有负电性原子(N 或 O),通过未共享电子对与血红素铁配位。杂环基团如咪唑、三唑、吡啶、喹啉、呋喃、苯并呋喃等具有与铁形成  $P\pi-D\pi$  键作用以及可能将在 P450 中保守的半胱氨酸上的巯基(SH)电子密度推向血红素铁 (Hawkins and Dawson, 1992),成为血红素的特别好的配体。抑制剂上的其他基团也有可能与 P450 活性位点上的某些残基相互作用 (Correia and Ortiz de Montellano, 1993)。

负电性配体原子(即 N 或 O)并不一定必须在芳香环上才有抑制作用,脂肪胺和醇亦有可能作为 P450 的抑制剂。

### 10.2.2 不可逆和机制型抑制剂

机制型抑制剂是指化合物经酶的作用而活化,由此可与血红素分子或蛋白质的活性位点结合 (Testa, 1990),后者如 SKF-525A 和氯霉素 (chloramphenicol)。还有一些与血红素结合的抑制剂是以自杀底物 (suicide substrate) 方式起作用,如甲撑二氧苯。另一类自杀抑制剂是卤代烷,特别是小分子量的氯代烷如氯仿,四氯甲烷,它们形成亚碳中间体以相类似甲撑二氧苯的方式与血红素连接 (Testa and Jenner, 1981)。

另一类重要的可以与血红素不可逆结合的机制型抑制剂是末端炔或烯,如 P450 的专性抑制剂 gestodene、开环巴比妥 (secobarbital)、烯丙基异丙基乙酰胺 (allylisopropylacetamide) 和乙炔基雌二醇 (ethinylestradiol) (Murray, 1992)。通常认为末端含烯和炔的 P450 抑制剂发挥作用是先通过形成乙烯酮,再与血红素分子的卟啉骨架发生反应 (Correia and Ortiz de Montellano, 1993)。这种化合物的作用伴随着血红素的失活和破坏,因此是非竞争性的。还有一些其他类型的化合物也可产生不可逆作用(类似于末端含烯或炔可进行血红素羟基化作用),如苯二氮烯和其他二氮烯 (diazenes), 苯肼 (phenylhydrazine) (phNHNHz) 和其他肼, 氨基苯并三唑 (aminobenzotriazoles), 烷基二氢吡啶 (alkyldihydropyridines) 以及二烷基二氢喹啉 (dialkydihydroquinolines) 等都与 P450 的辅基血红素反应,形成共价结合的血红素加合物 (Ortiz de Montellano and Reich, 1986)。

除与血红素或活性位点共价结合的 P450 抑制剂外,还有一些化合物可与 P450 的某

些类型的氨基酸残基如赖氨酸和半胱氨酸反应(表 10.7)。微粒体 CYP2B4 的表面暴露的赖氨酸残基被不可逆化学修饰,可能抑制 P450 的活性(通过阻断 P450 与其氧化还原搭档相互作用)。

另一类更特异性的 P450 抑制剂是抗体,它们也与表面特征有关。识别 P450 表面的抗原决定于其产生的抗体可以阻断 P450 与其氧化还原搭档的相互作用(Edwards *et al.*, 1995; Murray *et al.*, 1993a),抗体也有可能阻碍底物进入血红素,这两种情况特异性抗体都起抑制剂作用。

### 10.2.3 金属离子作 P450 的抑制剂

金属离子可以抑制 P450,但通常对 P450 不表现特异性(Testa and Jenner, 1981)。目前有些证据表明,如硝酸铅优先抑制 CYP1A2(Degawa *et al.*, 1993),而镉和汞盐可以抑制 CYP2E,但不抑制 CYP3A(Alexidis *et al.*, 1994)。

金属离子如  $\text{Co}^{2+}$  作为 P450 的抑制剂的可能机制是  $\text{Co}^{2+}$  能抑制血红素的生物合成和增强血红素的降解速率。除一些其他过渡金属和重金属离子外,也发现金属盐具有相同的机制。

镉的作用方式可能不同,它是通过促进 P450 转化为其失活态的 P420 而起作用。这可能涉及到与硫醇或羧酸基团的结合而影响蛋白质的构象,其作用位点在血红素结合位点附近,有可能是连接血红素的保守半胱氨酸。血红素远端、保守苏氨酸上游某位置的保守酸性残基(天冬氨酸或谷氨酸)也有可能与  $\text{Co}^{2+}$  结合。

### 10.2.4 P450 抑制剂的应用

P450 在生物体具有重要的物质代谢作用,其催化作用的抑制可以改变物质的代谢途径或速率。由于 P450 介导的某些反应是与生理有关的,特别是有些 P450 与甾醇代谢的密切联系,设计可以抑制生甾醇途径的抑制剂以控制疾病、真菌侵染和其他方面具有重要的临床意义(Correia and Ortiz de Montellano, 1993)。P450 抑制剂是有效的杀菌剂,一些吡咯类(azole)衍生物可以抑制从羊毛甾醇到麦角甾醇的生物合成途径,其中的 C-14 脱甲基步骤是由真菌 P450 CYP51 催化的。另一些 P450 的抑制剂主要用于不同癌症的处理,如绝经后的乳腺癌、前列腺癌以及相关的病症,如良性的前列腺增生(Correia and Ortiz de Montellano, 1993)。在高血压、醛固酮过多症(hyperaldosteronism)的处理以及缓解花生四烯酸、视黄酸代谢异常相关的病状也有潜在的用途(Correia and Ortiz de Montellano, 1993)。特别是芳化酶(CYP19)抑制剂已应用于乳腺癌的治疗,而抗前列腺剂(anti-prostatic agents)中包括具有抑制 CYP17 和 CYP19 的化合物。

药物代谢途径的预测对于药物开发很关键,因此,根据抑制原理设计 P450 介导代谢作用的诊断探针,可用于药剂的筛选。表 10.7 例出了一些 P450 的特异性抑制剂。P450 的抑制剂还可用作植物生长调节(Coulson *et al.*, 1984)、新除草剂开发、抗微生物剂和杀菌剂等(Durst, 1991; Durst and Benveniste, 1993)。

表 10.7 P450 的特异性抑制剂 (Lewis, 1996)

P450	特异性抑制剂	其他抑制剂
1A1	1-乙烃基芘(1-ethynylpyrene)	α-萘黄酮
1A2	furaniline	9-hydroxy ellipticine
2A6	diethyldithiocarbamate	甲吡酮
2B1	secobarbital	proadifen (SKF525A)
2C9	sulfaphenazole	
2D1	奎宁	
2D6	奎尼定	
2E1	二硫化四乙基秋兰姆(disulfiram)	二烯丙基化硫(diallyl sulfide)
3A4	gestodene	ketoconazole
4A1	十一碳炔酸	十二碳炔酸
11A1	22-amino-23,24-bisnor-5-cholen-3β-ol	(20R)-20-phenyl-5-prognene-3β,20-diol
11B1	甲吡酮	
17A1	(1S,2S,3S,5R)-(+)-异松莰烯基-4-咪唑基乙酸酯	4-环己基-甲基-2(4-吡啶基)-丙酸酯
19A1	4-羟基雄(甾)二酮	vorozole, aminoglutethimide
21	21,21-二氟黄体酮	
51	itraconazole	ketoconazole
101	甲吡酮	苯基咪唑

对 P450 底物结构专一性以及 P450 的活性特征的了解,有助于设计 P450 的专一性抑制剂 (Halpert, 1995)。专一性 P450 抑制剂除具有与血红素结合的结构,或有与 P450 与底物结合袋中的特定氨基酸相互作用的能力外,在拓扑上还要有与活性位点的互补特征。例如,P450 2D6 专一性抑制剂奎尼定(quinidine)具有两个起关键作用的氮原子,一个位于喹啉核上,它的作用是与血红素连接,而位于奎宁环的氮在生理 pH 条件下可以质子化,而与 2D6 活性位点的天冬氨酸残基发生离子对作用。另外,在奎尼定还有一羟基,与位于血红素囊附近的互补氨基酸残基(可能是丝氨酸)形成氢键 (Lewis, 1995a)。

### 参·考·文·献

Alexidis AN, Rekka EA, Kourounakis PN. 1994. Influence of mercury and cadmium intoxication on hepatic microsomal CYP2E and CYP3A subfamilies. *Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology*, 85:67~72

Burbach KM, Poland AM, Bradfield CA. 1992. Cloning of the Ah-receptor cDNA reveals a distinctive ligand-activated transcription factor. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 89:8185~8189

Cameron R, Sweeney GD, Jones K *et al.* 1976. A relative deficiency of cytochrome P450 and aryl hydrocarbon (benzo[a]pyrene) hydroxylase activity in hyperplastic nodules induced by 2-acetyl-aminofluorene in their diet. *Cancer Res.*, 36: 3888~3893

Conney AH. 1982. Induction of microsomal enzymes by foreign chemicals and carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons: GHA, Clowes Memorial Lecture. *Cancer Res.*, 42:4875~4917

Coon MJ, Ding X, Pernecky SJ *et al.* 1992. Cytochrome P450: Progress and predictions, *FASEB J.*, 6:669~673

Correia MA. 1991. Cytochrome P450 turnover. *Methods in Enzymology*, 206:315~325

Correia MA, Ortiz de Montellano PR. 1993. Inhibitors of cytochrome P450 and possibilities for their therapeutic application. *Frontiers in Biotransformation*, 8:75~146

Coulson CJ, King DJ, Wiseman A. 1984. Chemotherapeutic and agrochemical applications of cytochrome P450 ligands. *Trends in Biochemical Science*, 9:446~449

Daly AK, Idle JR. 1993. Genetics: Animal and human cytochrome P450 polymorphisms. In: *Cytochrome P450*. Schenkman, JB, Griem, H (eds.), Berlin: Springer-Verlag, 433~446

Degawa M, Arai H, Miura S et al. 1993. Preferential inhibitions of hepatic P4501A2 expression and induction by lead nitrate in the rat. *Carcinogenesis*, 14:1091~1094

Denomme MA, Homonoko K, Fujita T et al. 1985. Effects of substituents on the cytosolic receptor-binding avidities and aryl hydrocarbon hydroxylase induction potencies of 7-substituted 2,3-dichlorodibenzo-p-dioxins. *Molecular Pharmacology*, 27:656~661

Durst F. 1991. Biochemistry and physiology of plant cytochrome P450. *Frontiers in Biotransformation*, 4:191~232

Durst F, Benveniste L. 1993. Cytochrome P450 in plants. In: *Cytochrome P450* Schenkman JB, Griem H (eds.). Berlin: Springer-Verlag, 293~310

Edwards RJ, Murray BP, Singleton AM, Boobis AR. 1991. Orientation of cytochrome P450 in the endoplasmic reticulum. *Biochemistry*, 30:71~76

Edwards RJ, Singleton AM, Murray BP, Davies DS, Boobis AR. 1995. Short synthetic peptides exploited for reliable and specific targeting of antibodies to the C-termini of cytochrome P450 enzymes. *Biochem. Pharmacol.*, 49:39~47

Eisen HJ, Hannah RR, Legraverend C et al. 1983. The Ah receptor: Controlling factor in the induction of drug-metabolizing enzymes by certain chemical carcinogens and other environmental pollutants. In: *Biochem. Actions of Hormones*. Vol. X. Litwack, G, (ed.). New York: Academic Press, 227~257.

English N, Hughes V, Wolf C R. 1994. Common pathways of cytochrome P450 gene regulation by peroxisome proliferators and barbiturates in *Bacillus megaterium* ATCC 14581. *Journal of Biological Chemistry*, 269:26837~26841

Epand RM, Lester D S. 1990. The role of membrane biophysical properties in the regulation of protein kinase C activity. *Trends in Pharmaceutical Sciences*, 11:317~320

Fairchild CR, Ivy Sp, Rushmore T et al. 1987. Carcinogen-induced mdr overexpression is associated with xenobiotic resistance in rat preneoplastic liver nodules and hepatocellular carcinomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:7701~7705

Fujii-Kuriyama Y, Fujisawa-Sehara A, Sogawa K. 1989. Regulatory mechanism of gene expression of methylcholanthrene-inducible cytochrome P450. *Drug Metabolism Reviews*, 20:821~826

Fujii-Kuriyama Y, Imataka H, Sogawa K et al. 1992. Regulation of CYP1A1 expression, *FASEB J.*, 6:706~710

Fulco AJ. 1991. P450<sub>BM-3</sub> and other inducible bacterial P450 cytochromes: biochemistry and regulation, *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 31:177~203

Guengerich FP. 1988. Roles of cytochrome P450 enzymes in chemical carcinogenesis and cancer chemotherapy. *Cancer Res.*, 48:2946~2954

Gibson GG. 1992. Co-induction of cytochrome P4504A1 and peroxisome proliferation: A causal or casual relationship? *Xenobiotica*, 22:1101~1109

Gibson GG, Skett P. 1994. *Introduction to Drug Metabolism*, 2nd edition, Chapman & Hall, London

Golas CL, Prokipcak RD, Okey AB et al. 1990. Competitive binding of 7-substituted-2,3-dichlorodibenzo-p-dioxins with human placental Ah receptor-A QSAR analysis, *Biochemical Pharmacology*, 40:737~741

Goldberg DM. 1980. The expanding role of microsomal enzyme induction, its implications for clinical chemistry. *Clin. Chem.*, 26:691~699

Gonzalez FJ, Geboin HV. 1994. Role of human cytochrome P450 in the metabolic activation of chemical carcinogens and toxins. *Drug Metabolism Reviews*, 26:165~183

Halpert JR, Guengerich FP, Bend JR, Correia MA. 1994. Selective inhibitors of cytochromes P450. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 125:163~175

Hales BF, Jain R. 1980. Effects of phenobarbital and  $\alpha$ -naphthoflavone on the activation of cyclophosphamide to mutagenic

metabolites in vitro and kidney from male and female rats. *Biochem. Pharmacol.*, 29:2031~2037

Hallstrom I. 1985. Genetic regulation of the cytochrome P450 system in *Drosophila melanogaster*. II. Localization of some genes regulating cytochrome P450 activity. *Chem. Biol. Interact.*, 56:173~184

Hallstrom I, Grafstrom R. 1981. The metabolism of drugs and carcinogens in isolated subcellular fractions of *Drosophila melanogaster*. II. Enzyme induction and metabolism of benzo[a]pyrene. *Chem. Biol. Interact.*, 34:145~159

Hankinson O. 1995. The aryl hydrocarbon receptor complex. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 35:307~340

Hardwick JP. 1991. CYP4A subfamily: Functional analysis by immunohistochemistry and in situ hybridization. *Methods in Enzymology*, 206:273~283

Hawkins BK, Dawson JH. 1992. Oxygen activation by heme-containing monooxygenases: Cytochrome P450 and secondary amine monooxygenase. Active site structures and mechanisms of action. *Frontiers in Biotransformation*, 7:216~278

Heim MH, Meyer UA. 1991. Genetic polymorphism of debrisoquine oxidation. *Methods in Enzymology*, 206:173~183

Hill HAO, Roder A, Williams RJP. 1970a. The chemical nature and reactivity of cytochrome P450, Structure and Bonding, 8:123~151

Hines RN, Piechocki MP, Boncher PD. 1994. Molecular mechanisms controlling CYP1A gene expression, *Frontiers in Biotransformation*, 9:85~110

Jansson I. 1993. Post-translational modification of cytochrome P450. In *Cytochrome P450* Schenkman, JB and Griem H, (eds.). Berlin: Springer-Verlag, 361~380

Jansson I, Curti M, Epstein PM et al. 1990. Relationship between phosphorylation and cytochrome P450 destruction. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 283:285~292

Jefcoate CR, McNanara BC. 1991. Extra adrenal steroidogenesis. *Frontiers in Biotransformation*, 6:33~62

Jorbach GJM, van Asten JG, Rietjens IMCM et al. 1992. The effect of age on inducibility of various types of rat liver cytochrome P4502C3. *Journal of Biological Chemistry*, 268:6939~6944

Kemper B. 1993. Mammalian cytochrome P450 genes. *Frontiers in Biotransformation*, 8:1~58

Lake BG. 1995. Mechanisms of carcinogenicity of peroxisome-proliferating drugs and chemicals. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 35:483~507

Landers JP, Bunce NJ. 1991. The Ah receptor and the mechanism of dioxin toxicity. *Biochemical J.*, 276:273~287

Lewis DFV, Ioannides C, Parke DV. 1995a. A quantitative structure-activity relationship study on a series of 10 para-substituted toluenes binding to cytochrome P4502B4 (CYP2B4) and also their hydroxylation rates. *Biochemical Pharmacology*, 50: 619~625

Lewis DFV, Moereels H, Lake BG et al. 1994a. Molecular modeling of enzymes and receptors involved in carcinogenesis. *Drug Metabolism Reviews*, 26:261~285

Lewis DFV, Parker MG, King RJB. 1995e. Molecular modeling of the human estrogen receptor and ligand interactions based on site-directed mutagenesis and amino acid sequence homology. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 52:55~65

Lewis DFV. 1996. Cytochromes P450 structure function and mechanism. Taylor & Francis: London

Lin FH, Stohs SJ, Birnbaum LS et al. 1991. The effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin TCDD on the hepatic estrogen and glucocorticoid receptors in congeneric strains of Ah responsive and Ah nonresponsive C57BL/6J mice, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 108: 129~139

Meyer UA. 1991. Molecular mechanisms causing genetic polymorphisms of drug-metabolizing enzymes. *Frontiers in Biotransformation*, 6:1~32

Mitchell JR, Smith CV, Lauterburg BH et al. 1984. Reactive metabolites and the pathophysiology of acute lethal cell injury. In: *Drug Metabolism and Drug Toxicity*, Mitchell JR, Horning MG, (eds.). New York: Raven Press, 301~319

Moscow JA, Cowan KH. 1988. Multidrug resistance. *J. Natl. Cancer Inst.*, 80:14~20

Murray BP, Edwards RJ, Davies DS et al. 1993a. Conservation of a functionally important surface region between two families of the cytochrome superfamily, *Biochemical J.*, 292:309~312

Murray M. 1992. P450 enzymes: Inhibition mechanisms, genetic regulation and effects of liver disease, *Clinical Pharmacokinetic Concepts*. 23:132~146

Nebert DW, Negishi M. 1984. Environmental and genetic factors influencing drug metabolism and toxicity. In: *Drug Metabolism and Drug Toxicity*. Mitchell JR and Horning MG, 9eds. New York: Raven Press, 137~161

Nebert DW. 1988b. Genes encoding drug-metabolizing enzymes: Possible role in human disease. In: *Phenotypic Variations in Populations*. 45~64, Woodhead AD, Bender, MA and Leonard RC (eds.) Plenum Publishing Corp. Dispos. , 16~18

Nebert DW. 1989a. The Ah locus: Genetic differences in toxicity, cancer mutation and birth defects. *Critical Reviews in Toxicology*, 20:153~174

Nebert DW. 1989b. Regulation of the mouse dioxin-inducible P450 gene. In *Cytochrome P450: Biochemistry and Biophysics*. Schuster, I. (eds.), London: Taylor & Francis, 484~490

Nebert DW, Petersen DD, Fornace AJ. 1990. Cellular responses to oxidative stress: The [Ah] gene battery as a paradigm. *Environment Health Perspectives*, 88:13~25

Nebert DW, Petersen DD, Puga A. 1991. Human Ah locus polymorphism and cancer: Inducibility of CYP1A1 and other genes by combustion products and dioxin. *Pharmacogenetics*, 1:68~78

Nebert DW, Gonzalez FJ. 1985. Cytochrome P450 gene expression and regulation. *Trends in Pharmaceutical Science*, 6: 160~164

Nelson D R. 1999. Cytochrome P450 and the individuality of Species. *Archives of Biochemistry and Biophyscs*. 369(1):1~10

Oesch-Barthlomowicz B, Oesch F. 1990. Phosphorylation of cytochrome P450 isoenzymes in intact hepatocytes and its importance for their function in metabolic processes. *Archives of Toxicology*, 64: 257~261

Okey AB, Roberts EA, Harper PA *et al*. 1986. Induction of drug metabolizing enzymes: Mechanisms and consequences. *Clin. Biochem.* , 19:132~141

Okey AB. 1990. Enzyme induction in the cytochrome P450 system. *Pharmacology and Therapeutics*, 45:241~298

Omura T, Ishimura Y, Fujii-Kuriyama Y (eds.). 1993. *Cytochrome P450* (2nd edition). Tokyo: Kodansha, 1993

Ortiz de Montellano PR, Reich NO. 1986. Inhibition of cytochrome P450: heme-binding site and heme reactivity, in *Cytochrome P450*. Schenkman, JB and Griem H, (eds.). Berlin: Springer-Verlag, 169~181

Padmanaban G, Nirodi CS. 1994. Regulation of phenobarbitone-inducible cytochrome P450 gene expressin. *Frontiers in Biotransfrromation*, 9: 60~84

Park BK, Breckenridge AM. 1981. Clinical implications of enzyme induction and enzyme inhibition. *Clin. Pharmacokinet*, 6:1~24

Poland A, Glover E. 1974. Comparison of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo- $\rho$ -dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons. Examination of the mechanism of toxicity. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* , 22:517~554

Porter TD, Coon MJ. 1991. Cytochrome P450: multiplicity of isoforms, substrates and catalytic and regulatory mechanisms. *J. Biol. Chem.* , 266:13469~13472

Price-Evans DA. 1993. *Genetic Factors in Drug Therapy*, Cambridge: Cambridge University Press

Pyerin W, Taniguchi H. 1991. Post-translational modification by phosphorylation; Control of cytochrome P450 and associated enzymes. in *Molecular Aspects of Monooxygenases and Bioactivation of Toxic Compounds*. Arinc, E. , Schenkman JB and Hodgson E (eds.). New York: Plenum, 199~232

Reyes H, Reisz-Porszasz S, Hankinson O. 1992. Identification of the Ah receptor nuclear translocator protein (Arnt) as a component of the DNA binding form of the Ah receptor. *Science*, 256:1193~1195

Richard-Foy H. 1994. A way into the packaging. *Nature*, 370: 417~418

Ryan DE, Thomas PE, Wrighton SA *et al*. 1988. Ethanol-inducible rat and human liver cytochrome P450: characterization and role as high affinity N-nitrosodimethylamine demethylases. In: *Microsomes and Drug Oxidations*. PP3~11. Miners JO, Birkett DJ, (eds.) Taylor & Francis, London

Ryan DE, Levin W. 1993. Age- and gender-related expression of rat liver cytochrome P450. In: *Cytochrome P450*.

Schenkman, J. B. and Griem H, (eds.), Berlin: Spring-Verlag, 461~476

Shen AL, Kasper CB. 1993. Protein and gene structure and regulation of NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase. In Cytochrome P450. Schenkman, J. B. and Griem H, (eds.), Berlin: Spring-Verlag, 35~59

Sogawa K, Fujii-Kuriyama. 1997. Ah receptor, a novel ligand-activated transcription factor. *J. Biochem.*, 122:1075~1079

Testa B. 1990. Mechanisms of inhibition of xenobiotic-metabolizing enzymes. *Xenobiotica*, 20:1129~1137

Testa B, Jenner P. 1981. Inhibitors of cytochrome P450s and their mechanism of action. *Drug Metabolism Reviews*, 12:1~117

Tukey RH, Johnson EF. 1990. Molecular aspects of regulation and structure of the drug-metabolizing enzymes. In *Principles of Drug Action* Pratt, WB and Taylor P, (eds.), New York: Churchill-Livingstone, 423~467

Waxman DJ. 1999. P450 gene induction by structurally diverse xenochemicals: Central role of nuclear receptors CAR, PXR and PPAR. *Arch. Biochem. Biophys.*, 369(1):11~23

Waxman DJ, Azaroff L. 1992. Phenobarbital induction of cytochrome P450 gene expression. *Biochem J.*, 281:577~592

Waxman DJ, Dannan GA, Guengerich FP. 1985. Regulation of rat hepatic cytochrome P450: Age-dependent expression, hormonal imprinting and xenobiotic inducibility of sex-specific isoenzymes. *Biochem*, 24:4409~4417

Wright MC, Paine AJ. 1994. Induction of the cytochrome P4503A subfamily in rat liver correlates with the binding of inducers to a microsomal protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 201:973~979

# 第十一章 细胞色素 P450 基因的异源表达系统

随着分子生物学和重组 DNA 技术的发展,人们可以对 P450 基因进行操作,并在异源的体系中表达。异源表达与天然表达的关系可见图 11.1。目标 P450 基因的 cDNA 可在多种表达系统中表达,用细菌、酵母、昆虫,还是哺乳动物细胞表达系统取决于各自的目标、费用、方便程度以及所需产量。

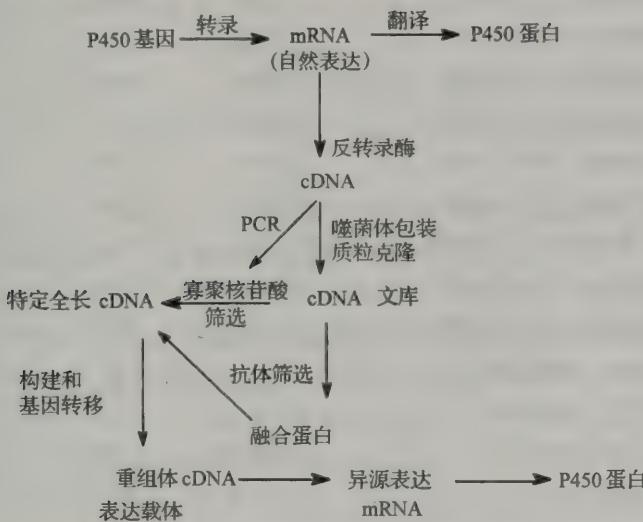


图 11.1 P450 天然(native)和异源(heterologous)表达(Doehmer and Griem, 1993)

## 11.1 哺乳动物细胞色素 P450 基因的异源表达系统

### 11.1.1 在细菌中的表达

大肠杆菌(*E. coli*)常用于 P450 的表达(表 11.1),它的优点是:①表达水平高,②容易操作,③有许多菌株突变体和含强启动子的载体可供使用(Friedberg *et al.*, 1999)。其缺点是在大多数情况下,哺乳动物 cDNA 在表达以前,先要经修饰。除修饰剪切 P450 cDNA 的 5' 和 3' 非翻译区外,启动密码子也需修饰以免哺乳动物的 mRNA 形成 2 级结构(Friedberg *et al.*, 1999)。

真核细胞的细胞色素 P450 紧密与大肠杆菌的细胞成分联结,对该细胞成分产生负担,而且活性酶需要非共价血红素的产生并掺入到新生的多肽中,这些特征表明高效表达异源 P450 对于大肠杆菌(宿主细胞)可能带来问题。但现在已建立了越来越多的表达系统成功地用于表达细胞色素 P450,在某些情况下,表达量超过 500nmol/L,为人们提供

了大量的具有酶活性的蛋白。

表 11.1 P450 在大肠杆菌中的表达(Gonzalez and Korzekwa, 1995)

P450	修饰	载体	细胞	产量
rbCYP2E1	无	pKKHC	MV1304	0.3%
rbCYP2E1	NH <sub>2</sub> 端去除第 3~29 氨基酸	pKKHC	MV1304	0.1%
raCYP7A1	NH <sub>2</sub> 端去除第 3~24 氨基酸	pKK233-1	XL1-Blue	2.0%
bCYP17A1	ATGTGGCTGCTCCTGGCTGTC GCT TTATTA A T	pCWOrt	JM1-0	16mg/L
CYP2C3	用经修饰的 CYP17A1 替代	pCWOrt	JM109	400nmol/L
hCYP1A2	用经修饰的 CYP17A1 替代	pCWOrt	JM109	700nmol/L
CYP4A11	用经修饰的 CYP17A1 替代	pCWOrt	JM109	40nmol/L
bCYP4A1-OR	用经修饰的 CYP17A1 替代	pCWOrt	NR	700nmol/L
CYP3A4-OR	用经修饰的 CYP17A1 替代	pCWOrt	DH5 $\alpha$	200nmol/L
CYP17A1-OR	用经修饰的 CYP17A1 替代	pCWOrt	DH5 $\alpha$	700nmol/L
CYP3A4	NH <sub>2</sub> 端切除第 3~12 氨基酸	pCWOrt	DH5 $\alpha$	370nmol/L
hCYP1A2	用经修饰的 CYP17A1 替代	pCWOrt	DH5 $\alpha$	245nmol/L
CYP2C9	用经修饰的 CYP17A1 替代	pCWOrt	DH5 $\alpha$	20nmol/L
hCYP2E1	Ala 为第二密码子, 切除 NH <sub>2</sub> 端的第 3~21 氨基酸	pCWOrt	DH5 $\alpha$	40nmol/L
hCYP1A1	Ala 为第二密码子	pCWOrt	DH5 $\alpha$	25nmol/L
CYP6A1	Ala 为第二密码子	pCWOrt	DH5 $\alpha$	20mg/L

注: NR: 未报道, OR: P450 还原酶(NADPH-细胞色素 P450 氧化还原酶)。

rb: 兔, ra: 大鼠, b: 牛, h: 人。

哺乳动物 P450 在细菌中高水平表达, 如不对酶的氨基末端进行修饰是非常困难的。天然 CYP2E1 在 *E. coli* 中得到了具有催化活性的表达, 但它的表达水平只占总 *E. coli* 蛋白的 0.3% (Larson *et al.*, 1991a)。去除氨基酸 3~29 残基并未提高表达水平, 但表达的酶仍保持其催化活性 (Larson *et al.*, 1991b), 且该修饰(切除部分序列的 CYP2E1) 仍与细菌的脂双分子层紧密结合, 表明将蛋白锚定在膜上并非绝对需要疏水氨基末端。

胆固醇 7 $\alpha$  羟化酶(CYP7A1), 经氨基酸末端修饰后在大肠杆菌中得到表达 (Li and Chaing, 1991), 采取的方法是其启动子 Met Met Ala 序列修饰为 Met Ala。第 2 个密码子用丙氨酸(Ala)的密码子替换, 因为 Ala 是 T7 噬菌体在大肠杆菌中高水平表达钟爱的密码子 (Looman *et al.*, 1987)。兔 CYP2E1 在位置 2 本身就是丙氨酸, 因此可以在大肠杆菌中表达(虽然水平低)。经修饰的 CYP7A1 在 *E. coli* 中的表达水平类似兔 CYP2E1, 产量为 0.2%。当 CYP7A1 的 2~24 氨基酸残基被切除后, 其表达水平可以增加 10 倍。且酶主要存在于细胞提取液部分, 这不同于全长 P450 只存在于膜分级中 (Li and Chaing, 1991)。该 P450 具有活性, 表明 N-末端区并非催化活性所需。这类似于 CYP2E1, 不同之处是重组时需要过量的 P450 还原酶才有活性, 而不需磷脂。

牛 CYP17A1 的修饰型也在大肠杆菌中得到表达 (Barnes *et al.*, 1991), 其第 2 个密

码子变成 GCT 编码的甘氨酸,密码子 4 和 5 被修饰成 TTA 以使 mRNA 的 5' 端含 AT 丰富,以此类似于 *E. coli* 的 mRNA(Stormo *et al.*, 1982)。密码子 6 和 7 的最后一个核苷酸也分别变成 A 和 T,以减少形成二级结构的可能性。在未经修饰的情况下,在细胞提取液中未检测出 CYP17A1 的脱辅基蛋白(apoprotein),而经修饰后可以产生全酶,并可与 P450 还原酶重组具有催化活性,P450 的表达水平达 16mg P450/L。

由于 CYP17A1 的 N-末端修饰可以显著增强在大肠杆菌中的表达,它常被用于替换其他哺乳动物 P450 的 NH<sub>2</sub> 区作为加强表达的手段。如以上提到的,去除疏水区仍可保持酶的活性,因此 N-末端修饰不会改变催化活性。表 11.1 列出了一些在大肠杆菌中表达的 P450,在大多数情况下修饰过的 CYP17A1 的 5' 端被用于替代 cDNA 的天然 5' 端。这一改变,表达的活性酶的平均值可达 700nmol/L,但表达水平因 P450 种类而异,CYP2C9 的值仅为 20 nmol/L (Sandhu *et al.*, 1993)。人 CYP1A1 的表达通过替代第二个密码子(Leu)为 Ala 和使 5' 区 AT 丰富(沉默替换),表达产量达 25nmol/L(Guo *et al.*, 1994),家蝇 CYP6A1 通过改变第二密码子为丙氨酸(Ala),在大肠杆菌中也得到表达(Andersen *et al.*, 1994)。

从细菌膜提取液中分离 P450 的快速纯化方法也已建立(Sandhu *et al.*, 1994)。在高浓度去污剂存在的情况下,大多数细菌蛋白结合在 DEAE-Sephacel 上,而 P450 则随外水流出。用羟基磷灰石除去去污剂,得到的 P450 制备液比含量可达 15nmol/mg (Gillam *et al.*, 1993)。在 CM-sepharose 上进一步层析得到比含量高达 23 nmol/mg 的纯制备液 (Gillam *et al.*, 1993)。高浓度的去污剂可以破坏 P450 的稳定性,产生 P420,但加入  $\alpha$ -萘黄酮(CYP1A1 和 CYP1A2 的特异性配体和底物)和 4-甲基吡唑(与 CYP2E1 结合)可以解决这一问题。羧基末端的多组氨酸(polyhistidine)尾不影响酶的活性,这一性质已被有效地用于亲和纯化,且相分离方法已成功地应用以简化纯化程序(Gonzalez and Kozekwa, 1995)。

从大肠杆菌中制备目标 P450 具有产量高、经济、方便的特点,但要测定其活性需要将表达的 P450 与还原酶和/或细胞色素 b<sub>5</sub> 重组。理想的做法是在大肠杆菌中与 P450 共同表达还原酶(OR)和细胞色素 b<sub>5</sub> 以产生完整的代谢系统。甾醇的原位代谢用牛 CYP17A1 可以获得,表明细菌有与 P450 功能所需的电子传递链(Barnes *et al.*, 1991)。

为了产生催化自足的 P450,已构建 CYP4A1-OR 融合蛋白,采用的方法与大鼠 CYP1A1-OR(在酵母中表达)相同(Murakami *et al.*, 1987; Yabasaki *et al.*, 1988; Shiba *et al.*, 1990)。CYP4A1 的氨基酸 509 与大鼠 P450 还原酶的氨基酸 57 通过一个 Ser Thr 关节(hinge)融合在一起,CYP1A1 经修饰的 N-末端片段被用作 CYP4A1 的 5' 端,与密码子 23 融合(Fisher *et al.*, 1992b)。类似的方法已用于制备融合蛋白 CYP3A4(Shet *et al.*, 1993)和 CYP17A1(Shet *et al.*, 1994)。CYP4A1-OR 融合蛋白具有对月桂酸催化活性,加入纯化的 P450 还原酶可以进一步提高代谢速率,这些反应无需加入磷脂(Fisher *et al.*, 1992c)。

CYP17A1-OR 融合蛋白也表现出类似于非融合 P450 的催化活性,奇怪的是纯化的无膜型 P450 具有更高的孕甾酮(progesterone)或孕烯醇酮(pregnenolone)活性,加入磷脂抑制活性,加入 P450 还原酶并不增加孕甾酮 17-羟基化作用速率(Shet *et al.*, 1994)。在 *E. coli* 整细胞中,孕甾酮的代谢速率比纯化酶的速率低得多,表明细胞内脂环境是抑

制性的或者细胞中还原力不足(Shet *et al.*, 1994)。相反,表达融合蛋白的完整酵母细胞表现出高的代谢速率(Shibata *et al.*, 1990)。

CYP3A4-OR 融合蛋白在非饱和脂类、去污剂和细胞色素 b<sub>5</sub> 存在下,具有甾醇羟基化作用以及硝基苯(Nifedipine)N-氧化作用。非饱和脂类以及去污剂也是天然酶重组系统所需用,这一点对 CYP3A 来说是独特的(Eberhart and Parkinson, 1991)。但经纯化的融合蛋白可以代谢红霉素和甲基苯异丙基苄胺。

P450 和 P450 还原酶可以在两个独立的启动子控制下,在 *E. coli* 中共同表达(Blake *et al.*, 1996)。还有一种方法是从单一的转录单位中共同表达 P450 和 P450 还原酶(Parikh and Guengerich, 1997)。

### 11.1.2 酵母表达系统

第一个用于成功表达哺乳动物 P450 的异源表达系统是酵母。用 pAAH 为载体,大鼠 CYP1A1 可以在啤酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)得到表达。许多不同类型的 P450 已在酵母中产生(Urban *et al.*, 1990; Oeda *et al.*, 1985; Guengerich *et al.*, 1991; Urban *et al.*, 1993; Eugster and Sengstag, 1993; Fulco, 1991)。表 2 例举了一些异生素代谢的 P450 在酵母中的表达。P450 的表达水平变异较大,从皮摩尔每升(pmole/L)至纳摩尔每升(nmol/L)。表达水平的差异可能由于不同 P450 的稳定性不同,也可能是载体方面的原因,如 cDNA 的非翻译区可能抑制转录和翻译(Pompon, 1988)。

许多不同的载体被采用,其中载体 pYeDP1 及其衍生物已被用于产生许多种 P450,这一载体采用磷酸甘油酸激酶的组成型启动子。酸性磷酸酯酶的启动子也用于表达大鼠 CYP1A2(Shimizu *et al.*, 1986)和人 CYP1A1(Eugster and Sengstag, 1990)。

在表达的蛋白可使载体致命的情况下可以使用可诱导性启动子,因为致命蛋白的产生,导致异源 DNA 从酵母细胞中丢失。可诱导的 YEpl3 载体包含金属硫蛋白 *cup1* 基因启动子,已用于表达兔 CYP2E1 和 CYP2E2(Ching *et al.*, 1991; Fujita *et al.*, 1990; Pernecky *et al.*, 1990)。pHE11 载体中的碱性磷酸酯酶启动子活性可通过将细胞处于低磷酸盐缓冲液而得到促进(Eugster and Sengstag, 1990),在大多数情况下,在低磷酯盐缓冲液中连续生长可以导致 P450 的表达。相似地,以 pYeDP 为基础的载体可通过改变介质中葡萄糖和半乳糖的量来操纵。有些在酵母中低水平表达的 P450 可以用可诱导启动子得到提高,但有报道指出,人 CYP1A1 用可诱导的和组成型的启动子,其表达水平无显著差异(Eugster and Sengstag, 1990)。

最广为使用的酵母株(用于 P450 表达)是 AH22(Oeda *et al.*, 1985),其他的酵母株如 YHE(Eugster and Sengstag, 1990),50L4(Fujita *et al.*, 1990),W303.1B(Pompon, 1988),Y1153(Krynetsky *et al.*, 1993),也可表达活性 P450。这些株系的差别主要在于标志和突变有所不同。现在还不清楚为什么 *S. cerevisiae* 酵母株如 AH22 可用于表达活性 P450,而其他基因型类似的酵母株,在相同条件下不能表达 P450。

酵母表达系统是催化自足的,因其内源性还原酶可以支持电子向哺乳动物 P450 传递。但酵母的 P450 还原酶可能在量上不足,因此可能不能支持最大的催化活性,这种情况下,需加入外源 P450 还原酶于微粒体制备液中。哺乳动物 P450 还原酶与 P450 在酵

母中共表达,可以增加催化活性(Murakami *et al.*, 1986)。将克隆的 P450 还原酶置于强半乳糖可诱导的启动子控制下,用同源的重组体替代天然酵母的 P450 还原酶,可以使内源性 P450 还原酶表达水平增至原来的 30 倍(Urban *et al.*, 1990)。

内源性酵母细胞色素 b<sub>5</sub>不是哺乳动物 P450 的有效供体,如将人的 b<sub>5</sub>也置于半乳糖可诱导的启动子控制,在半乳糖存在下得到高度表达(Urban *et al.*, 1990),得到的包含高含量 P450 还原酶和人的细胞色素 b<sub>5</sub>的酵母株必须具有全部电子传递组分,保证 CYP1A1 和 CYP3A4 加单氧酶的全活性(Truan *et al.*, 1993;)。但不同的 P450,它与 P450 还原酶及细胞色素 b<sub>5</sub>相互作用的能力不同,CYP3A4 需要更多的 P450 还原酶。CYP1A1 转换数(乙氧试卤灵 O-脱乙基化作用)因 P450 还原酶的存在而增至 4 倍。这相似于将人的 P450 还原酶与 P450 共同表达时的结果(Urban *et al.*, 1993)。含 P450 还原酶和 b<sub>5</sub>的表达系统中 CYP3A4 活性增加 60 多倍,这归因于 CYP3A4 对细胞色素 b<sub>5</sub>的需要。用人的 P450 还原酶替换酵母的 P450 还原酶可增加 P450 活性,说明人 P450 还原酶比酵母 P450 还原酶更有效(Urban *et al.*, 1993)。

酵母也是第一个产生功能性 P450 融合蛋白的系统(大鼠 CYP1A1 与 P450 还原酶融合)(Murakami *et al.*, 1987)。Shibata 等(1990)成功表达了一 CYP17A1-P450 还原酶融合蛋白。在巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)中已发现一催化自足的天然融合酶(P450<sub>BM-3</sub>, 120kD)(Narhi *et al.*, 1988),融合蛋白表达的成功也就不足为怪了。

许多 P450 在酵母中都得到表达,表 11.2 列出的只是其中的一部分。酵母似乎是定点突变研究可选择的表达系统(Uno and Imai, 1989; Shimizu *et al.*, 1994; Iwasaki *et al.*, 1994)。在理想的条件下,酵母系统用构建的载体表达微粒体 P450 已证明非常有效,产量通常可达 400nmol/L。

表 11.2 P450 在酵母中表达(Gonzalez and Korzekwa, 1995)

P450	载体	细胞	产量
CYP1A1	p31GAPFL	YHE2	156pmol/mg
CYP1A1	p31RIT	YHE2	
CYP1A1-OR	p31GAPFL	YHE2	
CYP1A2	p31GAPFL	YHE2	
CYP1A2-OR	p31GAPFL	YNW64	
CYP1A2-OR	pYeDP	W303.1B	
CYP2C8	pAAH5	334	250pmol/mg
CYP2C9	pAAH5	MT8-1	200pmol/mg
CYP2C9	pAAH5	AH22	
CYP2C9	pAAH5	D12	1nmol/L
CYP2C9	pAAH5	334	250pmol/mg
CYP2C18	pAAH5	334	60pmol/mg
CYP2C19	pAAH5	334	17pmol/mg
CYP2D6	pMA91	AH22	98pmol/mg
CYP2D6	pYeDP	Y1153	50pmol/mg
CYP3A4 (* NF-25)	pYeDP	Y1153	50pmol/mg
CYP3A4 (* PCN1)	pAAH5	W303.1B	8 × 10 <sup>5</sup> 分子/细胞
CYP3A4	pYeDP	AH22. D12	3nmol/L

注: \* CYP3A4 的突变体。

### 11.1.3 P450 在哺乳动物细胞中表达

#### 11.1.3.1 COS 细胞

由非洲绿猴(African green monkey)肾衍化的CV1细胞是用于哺乳动物P450表达的第一个哺乳动物细胞系统。SV40转染COS-1细胞支持含SV40复制起点的载体的表达。由于用于转染这些细胞的病毒有缺损的复制起点,因此即使T抗原可以表达,SV40也不能复制。为在COS细胞中产生有活性的P450,cDNA必须克隆到表达载体上,将构建的DNA转染进COS-1或COS-7细胞中,DNA在细胞中复制2~3天后,收集细胞用于活性测定。利用pCD载体和COS-1细胞,表达了产生脱氢表雄酮(dehydroepiandrosterone)所需的孕激素17 $\alpha$ -羟化酶和17,20-裂解酶的双重催化活性(Zuber *et al.*, 1986)。COS细胞系统应用较广,因为该系统简单,cDNA插入载体前无需修饰,其活性在克隆cDNA入载体后几天就可测定(Clark and Warterman, 1991; Higashi and Fujii-Kuriyama, 1991)。这些细胞含有足够的P450还原酶以及细胞色素b<sub>5</sub>以支持P450活性。

表达P450可用许多不同载体,包括p91023(B)、pCD、pSVL和pCMV,其差异主要在用作转录的启动子,pCMV载体含有强的人巨细胞病毒(cytomegalovirus)启动子,P450的表达水平比其他载体高达10倍(Clark and Waterman, 1991)。

表 11.3 人 P450 在 COS 细胞中表达(Gonzalez and Korzekwa, 1995)

P450	载体	文献
CYP1A1	pSVL	McManus <i>et al.</i> , 1990
CYP1A2	pSVL	McManus <i>et al.</i> , 1990
CYP2A6	pSVL	Miles <i>et al.</i> , 1990
CYP2C8	p90123(B)	Veronese <i>et al.</i> , 1993
CYP2C9	p90123(B)	Veronese <i>et al.</i> , 1993
CYP2C18	pCMV-4	Furuya <i>et al.</i> , 1991
CYP3A4	pCMV-2	Ball <i>et al.</i> , 1992
CYP3A5	pCMV-2	Ball <i>et al.</i> , 1992
CYP4A11	pCMV-4	Imaoka <i>et al.</i> , 1993

COS细胞系统已用于结构-功能研究,以确定氨基酸替代对催化活性的效应(Higashi and Fujii-Kuriyama, 1991; Kronbach *et al.*, 1989; Veronese *et al.*, 1993; Luo *et al.*, 1994)。但由于P450表达水平低,用差光谱方法不容易准确地测定P450全酶含量。因此,即使特定突变体催化失活,也难以断定是P450折叠不当、参入血红素量的不同、还是氨基酸改变影响了酶的活性部位。表11.3列出了一些在COS细胞中表达的人的P450。COS系统可用作P450催化活性的筛选工具。

#### 11.1.3.2 痘苗病毒

痘苗病毒(Vaccinia virus)也已被用于表达一些大鼠和人的P450(Gonzalez *et al.*, 1991a; Gonzalez, 1993)。痘苗病毒使用有限,部分是因为有其他替代的表达系统,部分出于安全考虑,另一因素是生成一个重组体病毒所需步骤较多(Gonzalez *et al.*, 1991b)。痘苗的基因组达200 kbp,需要原位重组以形成含P450 cDNA的病毒。cDNA首先插入到质粒(plasmid),质粒再用野生病毒导入到哺乳动物细胞系中,利用病毒和质粒的同源性重组。然后用X-gal噬菌体鉴定程序选择重组体(Gonzalez *et al.*, 1991b)。一旦获得含P450 cDNA的病毒就可用于侵染任何哺乳动物细胞系以产生活性P450。

与其他一些系统不同,痘苗表达系统不需要修饰 cDNA,因为 5' 和 3' 非翻译区不影响表达水平。不同的 P450 表达水平类似,一般在 15~25 pmol/mg 细胞蛋白。HepG2 细胞被用作表达宿主,因为它含足够的内质网 P450 还原酶和 b<sub>5</sub>。痘苗病毒是裂解病毒,可以杀死细胞,因此在侵染 1~3 天内要收获细胞。

重组体痘苗病毒也被用于定点突变研究(Hanioka *et al.*, 1992; Aoyama *et al.*, 1989)以及表达一些人 P450、P450 还原酶及细胞色素 b<sub>5</sub>(表 11.4)。该系统在药物代谢研究中特别有用。重组体痘苗病毒用于侵染 HepG2 细胞,其最大 P450 催化活性通常等于甚至大于优化的酶重组体系。这些细胞在量上相似于肝微粒体的环氧化物水解酶活性(Shou *et al.*, 1994)。由于 P450 含量可以定量,仅需加入 NADPH 可以表现催化活性,因此痘苗病毒表达系统被认为是筛选可能代谢新药的 P450 的理想系统。这些酶已用于评估致变剂的活化作用(Aoyama *et al.*, 1989; Aoyama *et al.*, 1990b; Aoyama *et al.*, 1990)。

表 11.4 人 P450、P450 还原酶和细胞色素 b<sub>5</sub>在痘苗病毒中表达(Gonzalez and Korzekwa, 1995)

酶	文献
CYP1A1	Aoyama <i>et al.</i> , 1989
CYP2A6	Yamano <i>et al.</i> , 1990
CYP2B6	Yamano <i>et al.</i> , 1989a
CYP2C8	Rettie <i>et al.</i> , 1992
CYP2C9	Rettie <i>et al.</i> , 1992
CYP2C9 <sub>R114C</sub>	Rettie <i>et al.</i> , 1994
CYP206	Patten <i>et al.</i> , 1992
CYP2E1	Tyndale <i>et al.</i> , 1991
CYP2F1	Nhamburo <i>et al.</i> , 1990
CYP3A4	Aoyama <i>et al.</i> , 1989a
CYP3A5	Aoyama <i>et al.</i> , 1989a
CYP4B1	Nhamburo <i>et al.</i> , 1989
还原酶	Yamano <i>et al.</i> , 1989
细胞色素 b <sub>5</sub>	Aoyama <i>et al.</i> , 1990a

#### 11.1.4 P450 在昆虫细胞中的表达

杆状病毒(baculovirus)与痘苗病毒有许多相似之处,包含大的基因组、具裂解的生活周期,重组体病毒的组建需要原位重组(Smith *et al.*, 1983; Luckow and Summers, 1988)。但杆状病毒仅限于侵染昆虫细胞。当氯高铁血红素加在侵染周期过程的培养基中,P450 的表达水平可达 300~1000 pmol/mg 总细胞裂解液(Gonzalez *et al.*, 1991c)。

只有少量几种 P450 用该系统进行表达。CYP4A11(Imaoka *et al.*, 1993)、CYP3A4(Buters *et al.*, 1994)和 CYP19A1(Sigle *et al.*, 1994)等来源于人的 P450 在杆状病毒中表达,表达的 P450 与 P450 还原酶重组酶系,表现出一定的催化活性。杆状病毒寄主细胞的电子传递组分不足,P450 还原酶必须直接加到细胞提取液中以测定 P450 活性。替代的办法是在同一细胞中共同表达 P450 还原酶和 P450。共同表达技术获得的酶的催化活性近似于纯化的重组酶系(Tamura *et al.*, 1992)。

#### 11.1.5 稳定表达系统

##### 11.1.5.1 B 淋巴母细胞类(B lymphoblastoid)

B 淋巴母细胞已证明可以表达人的 P450(Crespi *et al.*, 1990a; Gonzalez *et al.*, 1991a; Langenbach *et al.*, 1992)。B 淋巴母细胞 AHH-1 TK +/− 支持包含 Epstein-Barr

病毒复制起点的染色体外(extrachromosomal)载体的复制。这些细胞包含单拷贝的胸腺激酶基因和次黄嘌呤磷酸核糖转移酶基因,因此十分适于遗传毒理学终点(genetic toxicology end points)研究。AHH-1 细胞含有足够的 P450 还原酶和细胞色素 b<sub>5</sub>, 支持 P450 的催化活性。

P450 cDNA 插入到包含可选择标记的质粒载体中,产生对潮霉素(hygromycin)B 的抗性,或在 1-组氨醇中可以生长。用潮霉素 B 和 1-组氨醇选择每细胞分别产生 5 和 40 个附加型拷贝数(episomal copy numbers)(Langenbach *et al.*, 1992)。在疱疹病毒(herpes virus)胸腺激酶启动子控制下的 cDNA 在 AHH-1 细胞中表达的效率比 CMV 启动子高。不同的 cDNA, P450 酶的表达水平不同,这部分是由于 5' 和 3' 非翻译区的不良效应。即使去除或改变这些序列(片段),表达水平仍然不稳定,这可能是由于表达的 P450 的稳定性不同。增加 cDNA 的拷贝数能提高表达水平。在某些情况下,与 P450 还原酶共表达, P450 酶的表达水平也上升。通过不同的操作,CYP3A4 的表达可以提高近 2 个数量级。增加 P450 还原酶含量可获得 CYP3A4 最大的活性。CYP3A4 需要更高含量的 P450 还原酶,这与其他表达系统的结果类似(Peyronneau *et al.*, 1992; Buters *et al.*, 1994)。表 11.5 列出了在 B 淋巴母细胞中表达的人 P450。

表 11.5 P450 在 B 淋巴母细胞类细胞中表达(Gonzalez and Korzekwa, 1995)

P450	载体	在微粒体蛋白产量/(pmol/mg)	参考文献
CYP1A1	pHSR	25	Penman <i>et al.</i> , 1994
CYP1A2	pEBVHistk	40	Penman <i>et al.</i> , 1994
CYP2A6	pMF6	55	Sugden <i>et al.</i> , 1985
CYP2B6	pHyHo	60	Crespi <i>et al.</i> , 1994
CYP2D6	pEBVHistk	160	Penman <i>et al.</i> , 1993
CYP2E1	pHyHo	40	Crespi <i>et al.</i> , 1994
CYP3A4	pHyHo	20	Crespi <i>et al.</i> , 1994

用两个独立的载体可以将多个 P450 同时表达在一单细胞中,每个载体包含几个 cDNA 表达盒(Crespi *et al.*, 1991a)。一个包含 CYP1A1、CYP1A2、CYP2E1、CYP3A4 以及微粒体环氧化物水合酶(epoxide hydrolase)细胞系(MCL-5),可以对不同类型的化学致癌物如多环芳烃,芳香胺以及低分子量的亚硝胺和黄曲霉毒素作出反应。MCL-5 细胞可用于预测致变剂和致癌剂的效应。

为获得最大量的表达,建立 B 淋巴母细胞系需要艰苦的试验过程。此细胞系一旦建立,则可以稳定培养达数个月,也可以根据需要贮存和重新培养。可用其微粒体与底物反应或原位将底物与细胞共温育(Gonzalez and Korzekwa, 1995)。

### 11.1.5.2 反转录病毒(retrovirus)

用反转录病毒转录的 P450 数量有限(Battula, 1989; Nouso *et al.*, 1992; Dai *et al.*, 1993; Tiano *et al.*, 1993; Salomaa *et al.*, 1993)。与 B 淋巴母细胞稳定表达系统不同,反转录病毒系统产生稳定的整合 cDNA。为产生一个表达 P450 的细胞系,在反转录病毒

长末端重复(LTR)控制下, cDNA 插入质粒中。质粒包含包装信号和可选择标记[通常是细菌磷酸核糖转移酶 II 基因, 具有对真核细胞中的抗生素 G418 的抗性]。这一组构被转染进包装细胞, 在那里 DNA 被包装, 分泌病毒粒子。由于原始的 DNA 不能复制, 这些病毒只能侵染和整合入细胞的基因组中。重组体病毒可用于侵染大多数哺乳动物细胞系。选择抗 G418 的克隆用于测定 P450 产量。在大多数情况下, 单拷贝的 cDNA 整合到染色体中, 其整合位点可能决定了 P450 在不同克隆中的表达水平。相对于 B 淋巴母细胞, 反转录病毒 P450 的表达水平较低, 约为 10pmol/mg 微粒体蛋白(Dai *et al.*, 1993)。

反转录病毒表达具有稳定整合在一些不同细胞系的优点。含 P450 还原酶和细胞色素 b<sub>5</sub> 的 HepG2 细胞已用于表达 CYP2E1 (Dai *et al.*, 1993) 以及人 CYP2A6 (Tiano *et al.*, 1993; Salonpaa *et al.*, 1993)。反转录病毒表达系统未被广泛运用是因为分离一个表达克隆很复杂, 需要耗费较长的时间。

#### 11.1.5.3 其他稳定表达系统

V79 细胞被开发用于稳定表达 P450 (Doehmer and Oesch, 1991; Doehmer, 1993)。选择这些细胞是因为它们被广泛用于遗传毒理学和真核生物的致变分析。用标准的 SV40-衍生的表达载体(包含一个可选择的标记)转化细胞, 发生自动整合, 由选择性标记筛选出表达克隆。除人 CYP1A1 (Schmalix *et al.*, 1993)、CYP1A2 (Wolfel *et al.*, 1992) 和 CYP2D6 外 (Fisher *et al.*, 1992a; Fisher *et al.*, 1994), 一些大鼠的 P450 也在 V79 细胞中产生。表达 P450 的 V79 细胞已被用于代谢研究和细胞毒性分析。

用类似的方法, 人 CYP1A2 表达在人的支气管上皮细胞中, 这些细胞被 SV40 T 抗原无限增殖化 (immortalized), 可保持原代细胞的特征。它们也表达 P450 还原酶和其他的 II 相酶。用反转录病毒和标准的转染方法, 产生包含由 CMV 启动子驱动的整合的 cDNA 表达盒。这些细胞已用于细胞毒性和突变分析。

CYP1A2、N-乙酰基转移酶 2 (NAT2) 和 P450 还原酶 cDNA 同时表达在中国仓鼠 (Chinese hamster) 的 CHL 细胞中, 产生的细胞对杂环胺 2-氨基-3-甲基咪唑并-[4,5-f] 喹啉 (IQ) 以及 2-氨基-3,8-二甲基咪唑并-[4,5-f] 喹啉 (MeIQx) 的细胞毒性敏感, 仅表达 CYP1A2 和 P450 还原酶的细胞对杂环胺不敏感, 这证明 NAT2 在活化作用中起作用 (Yanagawa *et al.*, 1994)。

芳化酶在中国仓鼠卵巢 CHO 细胞中表达, 所用的载体为 PH  $\beta$  Apr-1-neo, 芳化酶的表达受  $\beta$ -肌动蛋白启动子的控制 (Zhou *et al.*, 1990)。在 CHO 细胞中的拷贝数估计为 15。虽然表达的芳化酶数量少, 不能用差光谱定量, 但芳化酶测定的灵敏性高, 使该系统成为一个有用的表情系统。一些芳化酶的突变体已被表达并用于结构-功能研究 (Chen *et al.*, 1993)。

## 11.2 昆虫细胞色素 P450 基因的异源表达系统

昆虫 P450 cDNA 可以在一些异源表达系统, 如 *E. coli* 杆状病毒和酵母中表达。根据所用表达系统的目的来选择。

高含量的昆虫 P450 首先在 *E. coli* 异源表达成功 (Andersen *et al.*, 1994)。在构建

表达质粒时,通常在 5'-端增加 cDNA 的 A/T 含量的沉默替换或(和)使位置 2 含丙氨酸。有时在 C 末端加入组氨酸尾(tag)有利于表达蛋白的进一步纯化。微粒体(CYP6A1, 6A2, 6A5, 4C7, 9A4)和线粒体(CYP12A1)蛋白已在 *E. coli* 中得到表达(Guzov *et al.*, 1998)。P450 酶系的其他成分如家蝇 NADPH 细胞色素 P450 还原酶和细胞色素 b<sub>5</sub> 的 cDNA 也在 *E. coli* 成功表达。

杆状病毒介导的鳞翅目细胞系表达系统被用于表达香芹黑凤蝶(*Papilio polyxenes*)的 CYP6B1 和 CYP6B4(Hung *et al.*, 1997; Ma *et al.*, 1994)以及果蝇(*D. Melanogaster*)的 CYP6A2(Dunkov *et al.*, 1997)。表达细胞裂解液具有代谢呋喃香豆素(CYP6B1, CYP6B4)和多种外源物质(CYP6A2)的能力,表明寄主细胞可以提供 P450 还原酶,该酶具有与异源 P450 相互作用的能力。要表达高水平的功能性 P450(0.37nmol/mg 或 49nmol/L 的 CYP6A2)需要在细胞培养介质中加入血红素。在细胞裂解液中加入 P450 还原酶和细胞色素 b<sub>5</sub> 可以增加 P450 的活性达 30 倍(Dunkov *et al.*, 1997)。

CYP6A2(*D. Melanogaster*)可在酵酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中表达,其活性蛋白的含量为 0.16~0.24nmol/mg 微粒体蛋白(Saner *et al.*, 1996)。与人 P450 还原酶共表达,转化的酵母可以活化黄霉毒素 B1 和另两种致癌物,产生的代谢物表现出细胞毒性。

### 11.3 植物细胞色素 P450 基因的异源表达系统

植物 P450 异源表达可以对克隆的 cDNA 进行功能鉴定,另一方面可以生产遗传改良的植物(Bolwell *et al.*, 1994),植物 P450 已报道的表达系统分述如下:

#### 11.3.1 酵母表达系统

一些植物的 P450(鳄梨 CYP71A1, 菊芋 CYP73A1, 紫苜蓿 CYP73A3)已在酵酒酵母中表达。用酵母的 GAL1、GAL4 或 GAL10/CYPC1 半乳糖——可诱导的启动子转录超量表达的 P450 蛋白,可利用内源性酵母 NADPH-细胞色素 P450 还原酶作为电子传递体(Urban *et al.*, 1994; Fahrendorf and Dixon, 1993; Bozak *et al.*, 1990)。有两个因素降低 P450 的转换率,即酵母 NADPH P450 还原酶不足,和酵母 NADPH P450 还原酶和植物 P450 的电子传递效率不是最优。菊芋 CYP73A1 可以在一个超量表达 NADPH P450 还原酶的酵母系统中得到了较好地表达(Urban *et al.*, 1994),但表达的 P450 与酵母细胞中的 NADPH-P450 还原酶的亲和性下降,表明植物 P450 的最优表达还需要共同表达一个合适的植物 NADPH-依赖的 P450 还原酶,Durst 和 Nalson(1995)的系统是一个成功的例子。

#### 11.3.2 杆状病毒介导的昆虫细胞表达系统

利用杆状病毒包衣蛋白启动子驱动 P450 序列的转录,许多哺乳动物(Asseffa *et al.*, 1989; Ohta *et al.*, 1991; Barnes *et al.*, 1994)和昆虫(Ma *et al.*, 1994; Hung *et al.*,

1997)在杆状病毒介导的昆虫 sf9 或 Tn5 细胞中成功表达,在植物中只有一个尝试即编码小檗碱合酶的 CYP80(Kraus and Kutchan, 1995)。异源表达的 P450 蛋白可以有效地与昆虫内源性的 NADPH-P450 还原酶偶联。这一系统的主要优点是对大多数 P450 对底物的反应性可以直接用整个细胞裂解液来检测而无需用制备微粒体。

### 11.3.3 大肠杆菌

至今,仅有 1 种植物的 P450(高粱的 P450Tyr)在大肠杆菌中表达的报道(Halkier *et al.*, 1995),其成功表达依赖于异丙基硫代- $\beta$ -D-半乳糖苷-可诱导的启动子的转录、N-末端疏水肽氨基酸长度降低 14 或 25 个氨基酸、与小牛 17 $\alpha$ -羟化酶交换前端 8 个密码子。

以细菌表达 P450 和 NADPH-P450 还原酶(OR)具有较大的困难,因为存在蛋白水解酶(proteolysis)和隔离体(inclusion body)(Porter *et al.*, 1987),但高水平的细菌表达在 20 世纪 90 年代早期已获得成功(Larson *et al.*, 1991a; Barnes *et al.*, 1991)。用酵母为表达系统的工作还在继续。Imaoka 等(1996)在啤酒酵母中表达了 9 个人 P450,并测定了纯化酶的催化活性,利用多克隆抗体测定了人肝样品中 P450 含量。

P450 表达的一个主要目标是建立酶的溶解性更高的分子型,以便结晶用于结构-功能分析。一个方法是表达一个带可剪切的氨基酸末端(膜)锚,该末端可用特定的蛋白酶除去。这个方法在酵母 P450 52A3 中取得了部分成功(Scheller *et al.*, 1994),但用 P450 1A2 未达到预期的效果(Dong *et al.*, 1996b)。为了绕过蛋白水解剪切,Negishi 等(Sueyoshi *et al.*, 1995)用可溶性更高的 24 个氨基酸残基的中极两性(amphipathic)螺旋(称为 peptidoglycan)替代小鼠 P450 2A4 的氨基末端。其他用切除疏水片断以提高水溶性的方法也取得部分成功(Gillam *et al.*, 1995; Von Wachenfeldt *et al.*, 1997)。异源表达的 P450 的膜拓扑学也有所研究(Dong *et al.*, 1996a)。

遗传工程产生的自足 P450-OR 融合蛋白是另一个主要的研究领域。包括人 P450 1A1(Chun *et al.*, 1996)和 1A2(Parikh *et al.*, 1997)的融合蛋白要比单个蛋白活性更低。Sakaki 等(1996)将线粒体 P450(P450 C27,通常接受来自 Fe-S 蛋白皮质铁氧还蛋白)与酵母 P450 还原酶连接构成的酶对底物表现出高的氧化作用速率。Sibbesen 等(1996)构建了一个 3 成分的融合蛋白,包括细菌 NADH-假单孢氧还蛋白还原酶,假单孢氧还蛋白和 P450 101,在大肠杆菌中功能活性高,其转换速率达 30/min。P450 与 OR 在不同系统中共表达已成为一个普通的方法。Lee 等(1995)报道,P450 3A4 和 P450 还原酶在杆状病毒侵染的昆虫细胞中有高活性,该方法表达的其他酶还有 P450 2D6(Paine *et al.*, 1996),P450 2E1(Wang *et al.*, 1996)。Schneider 等(1996)在 V79 CHO 细胞中共表达 P450 3A4 和 P450 还原酶,P450 还原酶的表达在大多数情况下,是 P450 的 5~10 倍时,催化活性非常高,如 P450 还原酶与 P450 3A4 在 CHO 细胞中共同表达可以增加细胞对黄曲霉素 B1 的敏感性达 1000 倍之多(Schneider *et al.*, 1996)。用双顺反子和双启动子构建在细菌中共同表达 P450 和 P450 还原酶也表现出类似的效率(Blake *et al.*, 1996; Shet *et al.*, 1997; Parikh *et al.*, 1997)。

P450 的异源表达系统已得到了广泛的应用。大肠杆菌表达可以提供天然蛋白

(Narhi *et al.*, 1988), 可以应用于抗体的廉价生产、结晶、生理生化分析以及作为生物反应器(Gonzalez and Korzekwa, 1995)。从大肠杆菌重组体获得的蛋白为揭示结构/功能相互关系提供了有价值的信息(Larson *et al.*, 1991a, 1991b; Ravichandran *et al.*, 1993; Haseman *et al.*, 1994)。大肠杆菌 P450-P450 还原酶融合蛋白也可能用在化学工业。酵母系统也可产生大量的酶, 在酵母中表达可形成完整的代谢工厂用于大规模代谢物生产。杆状病毒, 尽管在某种程度上需要特异的表达条件, 在需要高水平 P450 的研究中很有价值。标准的哺乳动物细胞系统, 在药物和致癌物代谢研究中非常有用, 并且在这领域还将继续发挥作用(Guengerich and Parikh, 1997)。

异源表达系统的一个主要实践用途是鉴定催化一个特定反应的酶, 已广泛用于确定 P450 在药物和前致癌物氧化作用中的功能(Guengerich *et al.*, 1995; Friedberg *et al.*, 1996)。Li 等(1996)建立了一个转基因小鼠模型(人胎儿 P450 3A7), 表现出更高的活化前致癌剂活性。由异源表达的 P450 的氧化活性的有关信息可以用于: ①预测生物对药物的可获得性。许多候选药物在药理筛选测试中具有满意的活性, 但因被代谢而快速清除, 不能到达靶标部位。重组系统在某种程度上可以用于预测药物的生物可获得性, 使选择成功。②预测药物-药物相互作用。例如, 假设 P450“X”在清除药物“A”中具有主要作用, 则已知抑制 P450“X”的药物 B 可以阻断药物“A”的代谢。这样(服用“A”和“B”的病人)就有可能产生不利的药理效应。

异源表达技术的另一主要用途是细菌致变测试(bacterial mutagenicity assay)。致变测试是所有新药以及工业化学品必须进行的, 并可用于评估环境污染物。这种测试的低耗和高效性对于基因毒性分析十分理想。Grant 等(1996)还建立了一种独特的方法用于测定不同酶在决定化合物毒效中的作用, Sf2 细胞(表达大鼠 P450 1A1)用作一些反应性化合物和染料毒性的指示体。

异源表达系统还可能用于精细化合物如立体-, 位置-选择性羟基化甾醇。另外, 该系统也可用于废弃化合物的微生物解毒即生物除污, 特别是工程 DNA 技术如随机诱变的发展, 可以改良这些酶使之在生物除污中发挥更大的作用。

随着技术的革新, 许多方法已用于产生有用的表达系统, 并在基础和应用研究领域中得到应用。虽然这些领域已取得了许多进展, 但仍在许多方面存在困难, 如: ①膜结合蛋白可溶型工程, ②新功能酶的开发, ③适于合成的规模表达技术。

## 参 考 文 献

Andersen J F, Utermohlen J G, Feyereisen R. 1994. Expression of house fly CYP6A1 and NADPH-cytochrome P450 reductase in *E. coli* and reconstitution of an insecticide metabolizing P450 system. *Biochem*, 33:2171~2177

Aoyama T, Gelboin H V, Gonzalez F J. 1990. Mutagenic activation of 2-amino3-methylimidazo[4,5-f]quinoline by complementary DNA-expressed human liver P450. *Cancer Res.*, 50:2060~2063

Aoyama T, Gonzalez F J, Gelboin H V. 1989. Human cDNA-expressed cytochrome P450 1A2: mutagen activation and substrate specificity. *Mol. Carcinog.*, 2: 192~198

Aoyama T, Nagata K, Yamazoe Y *et al.* 1990a. Cytochrome b<sub>5</sub> potentiation of cytochrome P450 catalytic activity demonstrated by a vaccinia virus-mediated in situ reconstitution system. *Proc. Acad. Sci. USA.*, 87:5425~5429

Aoyama T, Yamano S, Guzelian P S *et al.* 1990b. Five of 12 forms of vaccinia virus-expressed human hepatic cytochrome P450 metabolically activate aflatoxin B1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 87: 4790~4793

Aoyama T, Yamano S, Waxman D J *et al.* 1989a. Cytochrome P450 hPCNe, a novel cytochrome P450IIIA gene product

that is differentially expressed in adult human liver. *J. Biol. Chem.*, 264(10):88~95

Asseffa A, Smith S J, Nagata K *et al.* 1989. Novel exogenous heme-dependent expression of mammalian cytochrome P450 using baculovirus. *Arch. Biochem. Biophys.*, 274: 481~490

Ball S E, Maurer G, Zollinger M *et al.* 1992. Characterization of the cytochrome P450 gene family responsible for the N-dealkylation of the ergot alkaloid CQA 206-291 in humans. *Drug. Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.*, 20: 56~63

Barnes H J, Arlotto M P, Waterman M R. 1991. Expression and enzymatic activity of recombinant cytochrome P450 17-hydroxylase in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 5597~5601

Barnes H J, Jenkins C M, Waterman M R. 1994. Baculovirus expression of bovine cytochrome P450c17 in Sf9 cells and comparison with expression in yeast, mammalian cells and *E. coli*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 315: 489

Battula N. 1989. Transduction of cytochrome P3-P450 by retroviruses: constitutive expression of enzymatically active microsomal hemoprotein in animal cells. *J. Biol. Chem.*, 264: 2991~2996

Blake J A R, Pritchard M, Ding S *et al.* 1996. Coexpression of a human P450 (CYP3A4) and P450 reductase generates a highly functional monooxygenase system in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.*, 397: 210~214

Bolwell G P, Bozak K, Zimmerlin A. 1994. Plant cytochrome P450. *Phytochemistry*, 37: 1492~1506

Bozak K R, Yu H, Sirevag R, Christoffersen R E. 1990. Sequence analysis of ripening-related cytochrome P450 cDNAs from avocado fruit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 3904~3908

Buters JTM, Korzekwa K R, Kunze K L *et al.* 1994. cDNA-directed expression of human cytochrome P450 CYP3A4 using baculovirus. *Drug. Metab. Dispos. Biol. Fate. Chem.*, 122: 688~692

Chen S, Zhou D, Swiderek K M *et al.* 1993. Structure-function studies of human aromatase. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 44: 347~356

Ching M S, Lennard M S, Tucker G T *et al.* 1991. Expression of alcohol-inducible rabbit liver cytochrome P450 3a in *Saccharomyces cerevisiae* with the copper-inducible promoter. *Biochem. Pharmacol.*, 42: 753~758

Chun Y J, Shimada T, Guengerich F P. 1996. Construction of a human cytochrome P4501A1: rat NADPH-P450 reductase fusion protein cDNA, expression in *Escherichia coli*, purification and catalytic properties of the enzyme in bacterial cells and after purification. *Arch. Biochem. Biophys.*, 330: 48~58

Clark B J, Waterman M R. 1991. Heterologous expression of mammalian P450 in COS cells. *Methods. Enzymol.*, 206: 100~108

Crespi C L, Gonzalez F J, Steimel D T *et al.* 1994. A metabolically competent cell line expressing five cDNAs encoding procarcinogen-activating enzymes: application to mutagenicity testing. *Chem. Res. Toxicol.*, 4: 566~572

Crespi C L, Langenbach R, Penman BW. 1990. The development of a panel of human cytochrome P450 cDNAs. In: *Mutation and the environment*, M L, Mendelsohn, RL Albertini, ed. New York: WileyLiss, 97~106.

Crespi C L, Penman B W, Gelboin H V, Gonzalez F J. 1991. A tobacco smoke-derived nitrosamine, 4-(methylnitrosamo)- (3-pyridyl)-butanone, is activated by multiple human cytochrome P450s including the polymorphic human cytochrome P4502D6. *Carcinogenesis*, 12: 1197~1201

Crespi C L, Penman B W, Steimel D T *et al.* 1991a. The development of a human cell line stably expressing human CYP3A4: role in the metabolic activation of aflatoxin B1 and comparison to CYP1A2 and CYP2A3. *Carcinogenesis*, 12: 355~359

Crespi C L, Steimel D T, Aoyama T *et al.* 1990a. Stable expression of human cytochrome P4501A2 cDNA in a human lymphoblastoid cell line: role of the enzyme in the metabolic activation of aflatoxin B1. *Mol. Carcinog.*, 3;5:8

Dai Y, Rashba-Step J, Cederbaum A I. 1993. Stable expression of human cytochrome P4502E1 in HepG2 cells: characterization of catalytic activities and production of reactive oxygen intermediates. *Biochemistry*, 32:6928~6937

Doehmer J. 1993. V79 Chinese hamster cells genetically engineered for cytochrome P450 and their use in mutagenicity and metabolism studies. *Toxicology*, 82:105~118

Doehmer J, Griem H. 1993. Cytochromes P450 in genetically engineered cell cultures; the gene technological approach. In: *cytochrome P450*, Schenckman J B, Griem H (eds), Berlin: Springer-Verlag, 415~429

Doehmer J, Oesch F. 1991. V79 Chinese hamster cells genetically engineered for stable expression of cytochrome P450.

Methods Enzymol, 206: 117~123

Dong M S, Bell L C, Guo Z et al. 1996a. Identification of retained N-formylmethionine in bacterial recombinant cytochrome P450 proteins with the N-terminal sequence MALLAVFL: roles of residues 3-5 in retention and membrane topology. *Biochem*, 35: 10031~10040

Dong M S, Yamazaki H, Guo Z et al. 1996b. Recombinant human cytochrome P4501A2 and an N-terminal truncated form: construction, purification, aggregation properties and interactions with flavodoxin, ferredoxin and NADPH-cytochrome P450 reductase. *Arch. Biochem Biophys.*, 327: 11~19

Dunkov B C, Guzov V M, Mocelin G et al. 1997. The *Drosophila* cytochrome P450 gene *Cyp6a2*: Structure, localization, heterologous expression and induction by phenobarbital. *DNA Cell Biol.*, 16: 1345~1356

Durst F, Nelson D R. 1995. Diversity and evolution of plant P450 and P450-reductases, In *Drug Metabolism and Drug Interactions*, Durst F and O'Keefe, D P, eds., Freund Publishing House, England, 12: 189~206

Eberhart D C, Parkinson A. 1991. Cytochrome P450IIIA1 (P450p) requires cytochrome b<sub>5</sub> and phospholipid with unsaturated fatty acids. *Arch. Biochem. Biophys.*, 291: 231~240

Eugster H P, Batsch S, Wurgler F E et al. 1992. Functional co-expression of human oxidoreductase and cytochrome P450 1A1 in *Saccharomyces cerevisiae* results in increased EROD activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 185: 641~647

Eugster H P, Probst M, Wurgler F E et al. 1993. Caffeine, estradiol and progesterone interact with human CYP1A1 and CYP1A2: evidence from cDNA-directed expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Drug. Metab. Dispos.*, 21: 43~49

Eugster H-P, Sengstag C. 1990. Constitutive and inducible expression of human cytochrome P4501A1 in yeast *Saccharomyces cerevisiae*: An alternative enzyme source for in vitro studies. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 172: 737~744

Eugster H P, Sengstag C. 1993. *Saccharomyces cerevisiae*: An alternative source for human microsomal liver enzymes and its use in drug interaction studies. *Toxicology*, 82: 61~73

Fahrendorf T, Dixon R A. 1993. Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.) XVII: molecular cloning and expression of the elicitor-inducible cinnamic acid 4-hydroxylase cytochrome P450. *Arch. Biochem. Biophys.*, 305: 509~515

Fischer V, Vickers AEM, Heitz F et al. 1994. The polymorphic cytochrome P4502D6 is involved in the metabolism of both 5-hydroxytryptamine antagonists, tropisetron and ondansetron. *Drug, Metab. Dispos.*, 22: 269~274

Fischer V, Vogels B, Maurer G, Tynes R E. 1992a. The antipsychotic clozapine is metabolized by the polymorphic human microsomal and recombinant cytochrome P450 2D6. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 260: 1355~1360

Fisher C W, Caudle D L, Martin-Wixstrom C, Quattrochi L C et al. 1992b. High-level expression of functional human cytochrome P450 1A2 in *E. coli*. *FASEB J.*, 6: 759~764

Fisher C W, Shet M S, Caudle D L et al. 1992c. High-level expression in *E. coli* of enzymatically active fusion proteins containing the domains of mammalian cytochrome P450 and NADPH-P450 reductase flavoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 10817~10821

Friedberg T, Wolf C R. 1996. Recombinant DNA technology as an investigative tool in drug metabolism research. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, 22: 187~213

Friedberg T, Pritchard M P, Bandera M et al. 1999. Merits and limitations of recombinant model for the study of human P450-mediated drug metabolism and toxicity: an intralaboratory comparison. *Drug Metabolism Rev.*, 31(2): 523~544

Fujita V S, Thiele D J, Coon M J. 1990. Expression of alcohol-inducible rabbit liver cytochrome P450 3A in *Saccharomyces cerevisiae* with the copper-inducible promoter. *DNA. Cell. Biol.*, 9: 111~118

Fulco A J. 1991. P450BM-3 and other inducible bacterial P450 cytochromes: Biochemistry and regulation. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 31: 177~203

Furuya H, Meyer U A, Gelboin H V et al. 1991. Polymerase chain reaction-directed identification, cloning and quantification of human CYP2C18 mRNA. *Mol. Pharmacol.*, 40: 375~382

Gillam EMJ, Baba T, Kim B-R et al. 1993. Expression of modified human cytochrome P450 3A4 in *E. coli* and purification and reconstitution of the enzyme. *Arch. Biochem. Biophys.*, 305: 123~131

Gillam EMJ, Guo Z, Martin M V *et al.* 1995. Expression of cytochrome P450 2D6 in *Escherichia coli*. Purification and spectral and catalytic, characterization. *Arch. Biochem. Biophys.*, 319: 540~550

Gonzalez F J, Korzekwa K R. 1995. Cytochromes P450 expression systems. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 35:369~390

Gonzalez F J. 1993. Molecular biology of human xenobiotic-metabolizing cytochromes P450: Role of vaccinia virus cDNA expression in evaluating catalytic function. *Toxicology*, 82: 77~88

Gonzalez F J, Aoyama T, Gelboin H V. 1991a. Expression of mammalian cytochromes P450: using vaccinia virus. *Methods Enzymol.*, 206: 85~92

Gonzalez F J, Crespi C L, Gelboin H V. 1991b. DAN-expressed human cytochrome P450s: a new age of molecular toxicology and human risk assessment. *Mutat. Res.*, 247: 113~127

Gonzalez F J, Kimura S, Tamura S *et al.* 1991c. Expression of mammalian cytochrome P450 using baculovirus. *Methods Enzymol.*, 206: 93~99

Grant D F, Greene J F, Pinot F *et al.* 1996. Development of an in situ toxicity assay system using recombinant baculoviruses. *Biochem Pharmacol.*, 51:503~515

Guengerich F P, Parikh A. 1997. Expression of drug-metabolizing enzymes. *Current opinion in Biotechnology*, 8: 623~628

Guengerich F P. 1995. Human cytochrome P450 enzymes. In *cytochrome P450*. Edited by Ortiz de Montellano PR, New York: Plenum Press

Guengerich F P, Brain W R, Sari M A *et al.* 1991. Expression of mammalian cytochrome P450 enzymes using yeast-based vectors. *Methods. Enzymol.*, 206: 130~145

Guo Z, Gillam EMJ, Ohmori S *et al.* 1994. Expression of modified human cytochrome P450 1A1 in *E. coli* effects of 5' substitution, stabilization, purification, spectral characterization and catalytic properties. *Arch. Biochem. Biophys.*, 312: 436~446

Guzov V, Unnithan G C, Chernogolov AA *et al.* 1998. CYP12A1, a mitochondrial P450 from the house fly. *Arch. Biochem. Biophys.*, 359: 231~240

Halkier B A, Nielsen H C, Koch B *et al.* 1995. Purification and characterization of recombinant cytochrome P450tyr expressed at high levels in *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 322:369~377

Hanioka N, Gonzalez F J, Lindberg N A *et al.* 1992. Site-directed mutagenesis of cytochrome of the distal helix on the kinetics of testosterone hydroxylation. *Biochem.*, 31: 3364~3370

Hasemann C A, Ravichandran K G, Peterson JA *et al.* 1994. Crystal structure and refinement of cytochrome P450terp at 2.3 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 236:1169~1185

Higashi Y, Fujii-Kuriyama Y. 1991. Functional analysis of mutant P450(C21) genes in COS cell expression system. *Methods. Enzymol.*, 206: 166~173

Hung C F, Berenbaum M R, Schuler M A. 1997. Isolation and characterization of CYP6B4, a furanocoumarin-inducible cytochrome P450 from a polyphagous caterpillar (Lepidoptera: Papilionidae). *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 27:377~385

Imaoka S, Ogawa H, Kimura S *et al.* 1993. Complete cDNA sequences and cDNA-Directed expression of CYP4A11, a fatty acid omega-hydroxylase expressed in human kidney. *DNA Cell Biology*, 12:893~899

Imaoka S, Yamada T, Hiroi T *et al.* 1996. Multiple forms of human P450 expressed in *Saccharomyces cerevisiae*: systematic characterization and comparison with those of the rat. *Biochem Pharmacol.*, 51:1041~1051

Iwasaki M, Darden T A, Parker C E *et al.* 1994. Inherent versatility of P450 oxygenase. Conferring dehydroepiandrosterone hydroxylase activity to P450 2a-4 by a single amino acid mutation at position 117. *J. Biol. Chem.*, 269: 9079~9083

Kraus PFX, Kutchan T M. 1995. Molecular cloning and heterologous expression of a cDNA encoding berbamine synthase, a C-O phenol-coupling cytochrome P450 from the higher plant *Berberis stolonifera*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 2071~2075

Kronbach T, larabee T M, Johnson E F. 1989. Hybrid cytochromes P450 identify a substrate binding domain in P450IIC5 and P450IIC4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 8262~8265

Krynetsky E Y, Drutsa V L, Kovaleva I E *et al.* 1993. Effects of amino terminus truncation in human cytochrome P450IID6 on its insertion into the endoplasmic reticulum membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS. Lett.*, 336: 87~89

Langenbach R, Smith P B, Crespi C. 1992. Recombinant DNA approaches for the development of metabolic systems used in *in vitro* toxicology. *Mutat. Res.*, 277: 251~275

Larson J R, Coon M J, Porter T D. 1991a. Purification and properties of a shortened form of cytochrome P450 2E1: Deletion of the NH<sub>2</sub>-terminal membrane insertion signal peptide does not alter the catalytic activities. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 9141~9145

Larson J R, Coon M J, Porter T D. 1991b. Alcohol-inducible cytochrome P450IIE1 lacking the hydrophobic NH<sub>2</sub>-terminal segment retains catalytic activity and is membrane-bound when expressed in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 266: 7321~7324

Lee C A, Kadwell S H, Kost T A *et al.* 1995. CYP3A4 expressed by insect cells infected with a recombinant baculovirus containing both CYP3A4 and human NADPH-cytochrome P450 reductase is catalytically similar to human liver microsomal CYP3A4. *Arch. Biochem. Biophys.*, 319: 157~167

Li Y, Yokoi T, Kitamura R, Sasaki M *et al.* 1996. Establishment of transgenic mice carrying human fetus-specific CYP3A7. *Arch. Biochem Biophys*, 329: 235~240

Li Y C, Chaing J Y. 1991. The expression of catalytically active cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 266: 19186~19191

Looman A C, Bodlaender J, Comstock L J *et al.* 1987. Influence of the codon following the AUG initiation codon on the expression of a modified lacZ gene in *Escherichia coli*. *EMBO J.*, 6: 2489~2492

Luckow V A, Summers M D. 1988. Trends in the development of baculovirus expression vectors. *Bio-Technology*, 6: 47~55

Luo Z, He Y, Halpert J R. 1994. Role of residues 363 and 206 in conversion of cytochrome P450 2B1 from a steroid 16-hydroxylase to a 15 $\alpha$ -hydroxylase. *Arch. Biochem. Biophys.*, 309: 52~57

Ma R, Cohen M B, Brenbaum M R. *et al.* 1994. Black Swallowtail (*Papilio polyxenes*) alleles encode cytochrome P450s that selectively metabolize linear furanocoumarins. *Arch. Biochem. Biophys.*, 310: 322~340

McManus M E, Burgess W M, Veronese M E *et al.* 1990. Metabolism of 2-acetyl-aminofluorene and benzo(a)pyrene and activation of food-derived heterocyclic amine mutagens by human cytochromes P450. *Cancer Res.*, 50: 3367~3376

Miles J S, McLaren A W, Forrester L M *et al.* 1990. Identification of the human liver cytochrome P450 responsible for coumarin 7-hydroxylase activity. *Biochem. J.*, 267: 365~371

Murakami H, Yabusaki Y, Ohkawa H. 1986. Expression of rat NADPH-cytochrome P450 reductase in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Cell. Biol.*, 5: 1~10

Murakami H, Yabusaki Y, Sakaki T *et al.* 1987. A genetically engineered P450 monooxygenase: Construction of the functional fused enzyme between rat cytochrome P450s and NADPH-cytochrome P450 reductase. *DNA Cell Biol.*, 6: 189~197

Narhi L O, Wen L P, Fulco A J. 1988. Characterization of the protein expressed in *E. coli* by a recombinant plasmid containing the *Bacillus megaterium* cytochrome P450<sub>BM3</sub> gene. *Mol. Cell. Biochem.*, 79: 63~71

Nhamburo P T, Kimura S, McBride O W *et al.* 1990. The human CYP2F gene subfamily: Identification of a cDNA encoding a new cytochrome P450, cDNA-directed expression and chromosome mapping. *Biochem.*, 29: 5491~5499

Nhamburo P T, Gonzalez F J, McBride O W *et al.* 1989. Identification of a new P450 expressed in human lung: Complete cDNA sequence, cDNA-directed expression, and chromosome mapping. *Biochemistry* 28: 8060~8066

Nouso K, Thorgeirsson S S, Battula N. 1992. Stable expression of human cytochrome P450IIE1 in mammalian cells: metabolic activation of nitrosodimethyl-amine and formation of adducts with cellular DNA. *Cancer Res.*, 52: 1796~1800

Oeda K, Sakaki T, Ohkawa H. 1985. Expression of rat liver cytochrome P450MC, cDNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Cell Biol.*, 4: 167~175

Ohta D, Matsu-ura Y, Sato R. 1991. Expression and characterization of a rabbit liver cytochrome P450 belonging to the P450IIB subfamily with the aid of the baculovirus expression vector system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 175: 394~399

Paine MJI, Gilham D, Roberts GCK *et al.* 1996. Functional high level expression of cytochrome P450 CYP2D6 using baculoviral expression systems. *Arch. Biochem. Biophys.*, 321: 143~150

Parikh A, Guengerich F P. 1997. Expression, purification and characterization of a catalytically active human cytochrome P4501A2: NADPH-cytochrome P450 reductase fusion protein. *Protein Expr. Purif.*, 9: 346~354

Patten C J, Ishizaki H, Aoyama T *et al.* 1992. Catalytic properties of the human cytochrome P450 2E1 produced by cDNA expression in mammalian cells. *Arch. Biochem. Biophys.*, 299: 163~171

Penman B W, Chen L, Gelboin H V *et al.* 1994. Development of a human lymphoblastoid cell line constitutively expressing human CYP1A1 cDNA: substrate specificity with model substrates and promutagens. *Carcinogenesis*, 15(9):1931~1937

Penman B W, Reece J, Smith T *et al.* 1993. Characterization of a human cell line expressing high levels of cDNA-derived CYP2D6. *Pharmacogenetics*, 3: 28~39

Pernecký S J, Porter T D, Coon M J. 1990. Expression of rabbit cytochrome P450 IIE2 in yeast and stabilization of the enzyme by 4-methylpyrazole. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 172: 1331~1337

Peyronneau M A, Renaud J P, Truan G *et al.* 1992. Optimization of yeast-expressed human liver cytochrome P450 3A4 catalytic activities by coexpressing NADPH-cytochrome b<sub>5</sub>. *Eur. J. Biochem.*, 207: 109~116

Pompon D. 1988. cDNA cloning and functional expression in yeast *Saccharomyces cerevisiae* of naphthoflavone-induced rabbit liver P450 LM4 and LM6. *Eur. J. Biochem.*, 177: 285~293

Porter T D, Wilson T E, Kasper C B. 1987. Expression of a functional 78,000 dalton mammalian flavoprotein, NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase in *Escherichia coli*. *Arch Biochem. Biophys.*, 254: 353~367

Ravichandran K G, Boddupalli S S, Hasemann C A *et al.* 1993. Crystal structure of hemoprotein domain of P450BM-3, a prototype for microsomal P450. *Science*, 261: 731~736

Rettie A E, Korzekwa K R, Kunze K L *et al.* 1992. Hydroxylation of warfarin by human cDNA-expressed cytochrome P450: a role for P4502C9 in the etiology of (S)-warfarin-drug interactions. *Chem. Res. Toxicol.*, 5: 54~59

Rettie A E, Wienkers L C, Gonzalez F J *et al.* 1994. Impaired (S)-warfarin metabolism catalyzed by the R144C allelic variant of CYP2C9. *Pharmacogenetics*, 4:39~42

Sakaki T, Kominami S, Hayashi K *et al.* 1996. Molecular engineering study on electron transfer from NADPH-P450 reductase to rat mitochondrial P450c27 in yeast microsomes. *J. Biol. Chem.* 271:26209~26213

Salonpaa P, Hakkola J, Pasanen M *et al.* 1993. Retrovirus-mediated stable expression of human CYP2A6 in mammalian cells. *Eur. J. Pharmacol. Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 248: 95~102

Sandhu P, Baba T, Guengerich F P. 1993. Expression of modified cytochrome P450 2C10 (2C9) in *E. coli*, purification and reconstitution of catalytic activity. *Arch. Biochem. Biophys.*, 306: 443~450

Sandhu P, Guo Z, Baba T *et al.* 1994. Expression of modified human cytochrome P450 1A2 in *E. coli*: Stabilization and catalytic activities of the enzyme. *Arch. Biochem. Biophys.*, 309: 168~177

Saner C, Weibel B, Wurgler F E *et al.* 1996. Metabolism of promutagens catalyzed by *Drosophila melanogaster* CYP6A2 enzyme in *Saccharomyces cerevisiae*. *Environ. Mol. Mutagen.*, 27:46~58

Scheller U, Kraft T, Schosder K L *et al.* 1994. Generation of the soluble and functional cytosolic domain of microsomal cytochrome P450 52A3. *J. Biol. Chem.*, 269: 12779~12783

Schmalix W A, Maser H, Kiefer F *et al.* 1993. Stable expression of human cytochrome P450 1A1 cDNA in V79 Chinese hamster cells and metabolic activation of benzo[a]pyrene. *Eur. J. Pharmacol. Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 248:251~261

Schneider A, Schmalix W A, Siruguri V *et al.* 1996. Stable expression of human cytochrome P450 3A4 in conjunction with

human NADPH-cytochrome P450 oxidase in V79 Chinese hamster cells. *Arch Biochem Biophys*, 332: 295~304

Shet M S, Fisher C W, Arlotto M P *et al.* 1994. Purification and enzymatic properties of a recombinant fusion protein expressed in *E. coli* containing the domains of bovine P450 17A and rat NADPH-P450 reductase. *Arch. Biochem Biophys.*, 311: 402~417

Shet M S, Fisher C W, Holmans P L *et al.* 1993. Human cytochrome P450 3A4: Enzymatic properties of a purified recombinant fusion protein containing NADPH-P450 reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 11748~11752

Shet M S, Fisher C W, Estabrook R W. 1997. The function of recombinant cytochrome P450s in intact *Escherichia coli* cells: the 17 $\alpha$ -hydroxylation of progesterone and pregnenone by P450c17. *Arch. Biochem Biophys*, 339: 218~225

Shibata M, Sakaki T, Yabasaki Y *et al.* 1990. Genetically engineered P450 monooxygenases: Construction of bovine P450c17/yeast reductase fused enzymes. *DNA. Cell. Biol.*, 9: 27~36

Shimizu T, Murakami Y, Hatano M. 1994. Glu<sup>318</sup> and Thr<sup>319</sup> mutations of cytochrome P450 1A2 remarkably enhance homolytic O-O cleavage of alkyl hydroperoxides. An optical absorption spectral study. *J. Biol. Chem.*, 269: 13296~13304

Shimizu T, Sogawa K, Fujii-Kuriyama Y *et al.* 1986. Expression of rat cytochrome P450d in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS. Lett.*, 207: 217~221

Shou M, Korzekwa K R, Crespi C L *et al.* 1994. The role of twelve cDNA expressed human, rodent and rabbit cytochrome P450 in the metabolism of benzo(a)pyrene and benzo(a)pyrene trans-7,8-dihydrodiol. *Mol. Carcinog.*, 10: 159~168

Sibbesen O, De Voss J J, Ortiz da Montellano P R. 1996. Putidaredoxin reductase-putidaredoxin-cytochrome P450cam triple fusion protein. Construction of a self-sufficient *Escherichia coli* catalytic system. *J. Biol. Chem.*, 271: 22462~22469

Sigle R O, Titus M A, Harada N, Nelson S D. 1994. Baculovirus-mediated high-level expression of human placental aromatase (CYP19A1). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 201: 694~670

Smith G E, Fraser M J, Summers M D. 1983. Molecular engineering of the *Autographa California* nuclear polyhedrosis genome: deletion mutation within the polyhedron gene. *J. Virol.*, 46: 584~593

Stormo G D, Schneider T D, Gold L M. 1982. Characterization of translational initiation sites in *E. coli*. *Nucleic Acids. Res.*, 10: 2971~2996

Sueyoshi T, Park L J, Moore R *et al.* 1995. Molecular engineering of microsomal P450 2a-4 to a stable, water-soluble enzyme. *Arch. Biochem. Biophys.*, 322: 265~271

Sugden B, Marsh K, Yates J. 1985. A vector that replicates as a plasmid and can be efficiently selected in B-lymphoblasts transformed by Epstein-Barr virus. *Mol. Cell. Bio.*, 5: 410~413

Tamura S, Korzekwa K R, Kimura S *et al.* 1992. Baculovirus-mediated expression and functional characterization of human NADPH-P450 oxidoreductase. *Arch. Biochem. Biophys.*, 293: 219~223

Tiano H F, Hosokawa M, Chulada P C *et al.* 1993. Retroviral mediated expression of human cytochrome P4502A6 in C3H/10T1/2 cells confers transformability by 4-(methylnitrosamino)-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK). *Carcinogenesis*, 14: 1421~1427

Truan G, Cullin C, Reisdorf P *et al.* 1993. Enhanced in vivo monooxygenase activities of mammalian P450s in engineered yeast cells producing high levels of NADPH-P450 reductase and human cytochrome b<sub>5</sub>. *Gene*, 125: 49~55

Tyndale R, Aoyama T, Broly F *et al.* 1991. Identification of a new variant CYP2D6 allele lacking the codon encoding Lys-281. Possible association with the poor metabolizer phenotype. *Pharmacogenetics*, 1: 26~32

Uno T, Imai Y. 1989. Identification of regions functioning in substrate interaction of rabbit liver cytochrome P450 (laurate (omega-1)-hydroxylase). *J. Biochem.*, 106: 569~574

Urban P, Cullin C, Pompon D. 1990. Maximizing the expression of mammalian cytochrome P450 monooxygenase activities in yeast cells. *Biochimie*, 12: 463~472

Urban P, Truan G, Gautier J C *et al.* 1993. Xenobiotic metabolism in humanized yeast: engineered yeast cells producing human NADPH-cytochrome P450 reductase, cytochrome b<sub>5</sub>, epoxide hydrolase and P450s. *Biochem. Soc. Trans.*, 21: 1028~1034

Veronese M E, Doecke C J, Mackenzie P I *et al.* 1993. Site-directed mutation studies of human liver cytochrome P450 isoenzymes in the CYP2C subfamily. *Biochem. J.*, 289: 533~538

Von Wachenfeldt C, Richardson T H, Cosme J *et al.* 1997. Microsomal P450 2C3 is expressed as a soluble dimer in *Escherichia coli* following modifications of its N-terminus. *Arch. Biochem. Biophys.*, 339: 107~114

Wang H, Kawashima H, Strobel H W. 1996. cDNA cloning of a novel CYP3A from rat brain. *Biophys. Res. Commun.*, 221: 157~162

Wolfel C, Heinrich-Hirsch B, Schulz-Schalge T *et al.* 1992. Genetically engineered V79 Chinese hamster cells for stable expression of human cytochrome P450 1A2. *Eur. J. Pharmacol.*, 228: 95~102

Yabusaki Y, Murakami H, Sakaki T *et al.* 1988. Genetically engineered modification of P450 monooxygenases: functional analysis of the amino-terminal hydrophobic-region and honge region of the P450/reductase fused enzyme. *DNA Cell Biol.*, 7: 701~711

Yamano S, Aoyama T, McBride O W *et al.* 1989. Human NADPH-P450 oxidoreductase: complementary DNA cloning, sequence and vaccinia virus-mediated expression and localization of the CYPOR gene to chromosome 7. *Mol. Pharmacology*, 36: 83~88

Yamano S, Nhamburo P T, Aoyama T *et al.* 1989a. cDNA cloning and sequence and cDNA-directed expression of human P450 IIB1: identification of a normal and two variant cDNAs derived from the CYP2B locus on chromosome 19 and differential expression of the IIB mRNAs in human liver. *Biochemistry*, 28: 7340~7348

Yamano S, Tatsuno J, Gonzalez F J. 1990. The CYP2A3 gene product catalyzes coumarin 7-hydroxylation in human liver microsomes. *Biochem.*, 29: 1322~1329

Yanagawa Y, Sawada M, Deguchi T *et al.* 1994. Stable expression of human CYP1A2 and N-acetyltransferases in Chinese hamster CHL cells: mutagenic activation of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline and 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline. *Cancer Res.*, 54: 3422~3427

Zhou D, Pompon D, Chen S. 1990. Stable expression of human aromatase complementary DNA in mammalian cells: A useful system for aromatase inhibitor screening. *Cancer Res.*, 50: 6949~6954

Zuber M X, Simpson E R, Waterman M R. 1986. Expression of bovine 17 $\alpha$ -hydroxylase cytochrome P450 cDNA in non-teratogenic (COS) cells. *Science*, 234: 1258~1261.

## 第十二章 细胞色素 P450 的应用

随着人们对 P450 结构/功能关系、P450 表达调控机制认识的不断深入, P450 种类的不断发现以及新功能 P450 的产生, 还有方法和工艺方面的改进, 功能独特的 P450 在医药、环境、农业等各个领域将有广泛的应用。

### 12.1 细胞色素 P450 应用的几个重要技术

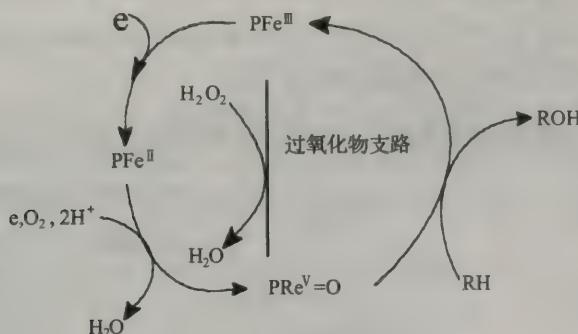
#### 12.1.1 定向进化技术(directed evolution)

P450 酶系在生物合成、外源物的降解和环氧化物的对映体的合成中都起关键作用。但其缺点是稳定性差和降解率低(特别对非天然底物), 并且在反应中需要电子供体等一些复杂的辅助因子再生系统, 因而阻碍了它作为独立酶的实际应用(Sheldon, 1999)。Arnold(1998)曾报道假单孢细菌(*Pseudomonas putida*)的细胞色素 P450cam 经“定向进化”技术得到的突变体能有效地利用过氧化氢( $H_2O_2$ )作为氧的来源, 通过“过氧化物支路”途径, 因此可以不经过复杂的辅助因子再生系统。此反应是过氧化氢( $H_2O_2$ )与氧化的铁卟啉复合体( $PFe^{III}$ )作用, 形成了活性的氧化剂( $PFe^{V=O}$ ), 底物(RH)与  $PFe^{V=O}$  反应生成产物(ROH), 酶又回到静止状态( $PFe^{III}$ )(图 12.1A)。

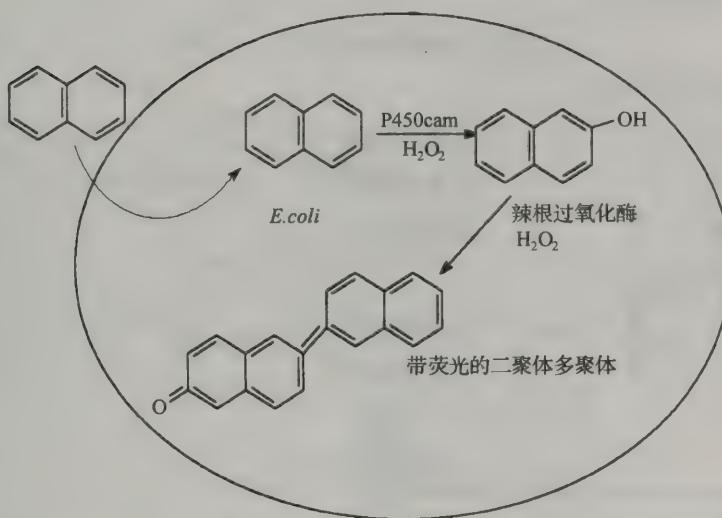
“过氧化物支路”反应的活性要比天然酶高达 20 倍以上, 反应中不再需要与 P450 有关的电子转移蛋白。这样的催化剂与天然酶系统比较是非常简便的。如与辣根过氧化酶(horseradish peroxidase, HRP)共同表达可以快速筛选出改进的突变体, 因这种改进的突变体可使 P450 的反应产物转化为荧光化合物, 如芳族底物(萘)被大肠杆菌细胞吸收后, 经加氧酶羟化, 此反应产物以  $H_2O_2$  作氧化剂被 HRP 氧化偶合, 偶合的反应产物产生颜色为较强的荧光物质。

辣根过氧化酶(HRP)是一种有 4 个二硫桥键的糖基化的血红素过氧化酶(Henrik-sen, 1998), 在大肠杆菌中不能功能的表达, 但由天然 HRP 基因的直接进化为活化型的 HRPIA6 变异体可以表达(Lin *et al.*, 1999)。变异体 HRPIA6 的天冬酰胺 255(天然酶的糖基化部位)被天冬氨酸置换, 这种置换可推测为在非天然环境中促使其折叠。在萘和  $H_2O_2$  存在的情况下, 加单氧酶细胞色素 P450cam 与 HRPIA6 一起在大肠杆菌中表达使萘变为光亮的荧光化合物。

细胞色素 P450cam 由易错聚合酶链反应(error-prone)PCR 和 HRPIA6 共同表达产生约 200 000 突变体, 在萘和  $H_2O_2$  的反应中, 用荧光数字图像筛选其活性。这种筛选方法的益处是不同的羟化取代部位导致不同的颜色。例如 1 或 2-萘酚和 2,7-二羟基萘加合产生红荧光, 2-萘酚与 1,5-二羟基萘加合则生成黄荧光。产物的发射光谱决定于反应物的相关摩尔的比率。这种筛选可观察出各种突变体的不同区域专一性(Sheldon, 1999; Joo *et al.*, 1999)。



A “过氧化物支路”反应(Sheldon, 1999)



B 辣根过氧化酶催化羟基化产物的偶合

图 12.1 “过氧化物支路”反应

### 12.1.2 电化学在 P450 催化反应中的应用

P450 酶系催化各种不同的底物需要电子供体(NADPH)和从 NADPH 转移两个电子到血红蛋白的电子运送蛋白。如微粒体黄素蛋白, NADPH—P450 还原酶, 或线粒体含黄素蛋白和铁-硫蛋白的线粒体电子转移程序。但用 NADPH 作为电子来源极不经济, 而且反应体系温育时间长时, 则要延长操作时间。因此需要一种对反应中的辅助因子能再生有效且稳定又经济的方法。Estabrook 等(1996)报道用电解方法, 通过电动活化介体传送电子与微粒体 P450 系统的黄素蛋白组分相互作用, 这种方法就可避免用 NADPH。用重组融合蛋白(含有纯化的 P450 和 NADPH—P450 还原酶)试验, 得到了满意的结果。Guryev 和 Gilevich(1993)用类似的电化学系统, 驱动肾上腺线粒体 P450scc 的活性, 在铁-硫蛋白(肾上腺皮质铁氧还蛋白)存在的情况下, 使胆固醇转化为孕甾烯醇。所用的介体

是钴络合物(cobalt sepulchrate<sup>3+</sup>), 化学名称为(S)—[(1,3,6,8,10,13,16,19—八氯杂二环—[6,6,6]廿碳烷)钴(Ⅲ)]<sup>3+</sup>。从下表中所列举的结果可以看出, 用电化学方法得到的底物代谢速率与用 NADPH 得到的结果基本相似。

表 12.1 P450—融合蛋白用电解或 NADPH 催化代谢速率的比较(Estabrook *et al.*, 1996)

融合蛋白和底物	反应类型	速率/[ nmol/(min·nmol) ]	
		电解	NADPH
<b>yF450(mBov17A/mRatOR)LI</b>			
黄体酮	17-羟基化作用	20	28
孕甾烯醇酮	17-羟基化作用	5.0	5.0
<b>vF450(mRat4A1/mRatOR)LI</b>			
月桂酸	$\omega$ -羟基化作用	2.0	5.0
<b>vF450(mHum3A4/mRatOR)LI</b>			
睾甾酮	6 $\beta$ -羟基化作用	2.6	10.0
红霉素	N-脱甲基作用	1.2	2.2
甲基苯异丙基苄胺	N-脱甲基作用	2.0	4.6
<b>vF450(mHum1A2/mRatOR)LI</b>			
咖啡因	N-脱甲基作用	0.75	1.5
丙咪嗪	N-脱甲基作用	1.2	2.0
<b>CYP102-BM3</b>			
月桂酸	$\omega$ -羟基化作用	110	900

Faulkner 等(1995)用电化学生成的还原物(cobalt(Ⅱ) sepulchrate trichloride)电催化驱动月桂酸  $\omega$ -羟化作用, 含 P450 1A1 的纯化重组蛋白或用 P450 4A1 加纯化的 NADPH-P450 还原酶的重组系统, 产生 12-羟基正十二烷酸的速率与用 NADPH 作为电子供体所得的结果有可比性。这些结果表明, 含不同的 P450 依赖电催化的生物反应器用作催化剂的发展将对化学上大规模地合成立体的或配向选择性羟化作用产物具有重要意义。

用碳-碱电极直接使电子转移到 CYP101(P450cam), 或用蒙脱石钠玻璃-碳黑电极对无底物细胞色素 P450cam 的快速异源氧还反应, 电子转移速率范围为 5~152/s, 此与从假单孢氧还蛋白(Pdx)天然电子转移到 P450cam 报道的数值是相近的(Wollenberger *et al.*, 2000)。

Reipa 等(1997)报道, 生物催化是由半导体电极将电子直接转移到假单孢氧还蛋白, 它作为生物反应器迅速和持续地将电子转移到 CYP101(P450cam), 使樟脑转化为 5-外-羟基樟脑的量近于化学计算值。反应中不需要 NADH 和假单孢氧还蛋白还原酶(PdR), 但需要溶解的氧。这种氧是由铂反向电极发生的。

以下以 P450cam 加单氧酶系统对底物(樟脑)羟化作用的天然的(图 12.2 上)和直接电极驱动的(图 12.2 下图)催化循环作一对比。底物与细胞色素血红素蛋白 CYP101

(P450cam)的氧化型结合,形成蛋白复合物 CYP<sup>o</sup>,它从还原的假单孢氧还蛋白 Pdx<sup>r</sup>接受第一个电子  $e_1$ 。在天然的循环中结合溶解的氧形成复合物 CYPO<sub>2</sub><sup>r</sup>,从 Pdx<sup>r</sup>接受第二个电子  $e_2$ ,此复合物分解产生立体专一性的羟基化产物(5-外羟基樟脑)。在电极驱动过程中,半导体工作电极给予氧化的假单孢氧还蛋白 Pdx<sup>r</sup>还原能力,省去了用 NADH 和假单孢氧还蛋白还原酶 PdR 为还原组分。所需要的氧来自厌氧的生物发生器反向电极表面水的电解。此连续催化循环可持续 5h 和酶转换数为 2600。产物形成的最高速率为 36nm[5-外羟基樟脑/(nmol·min)]

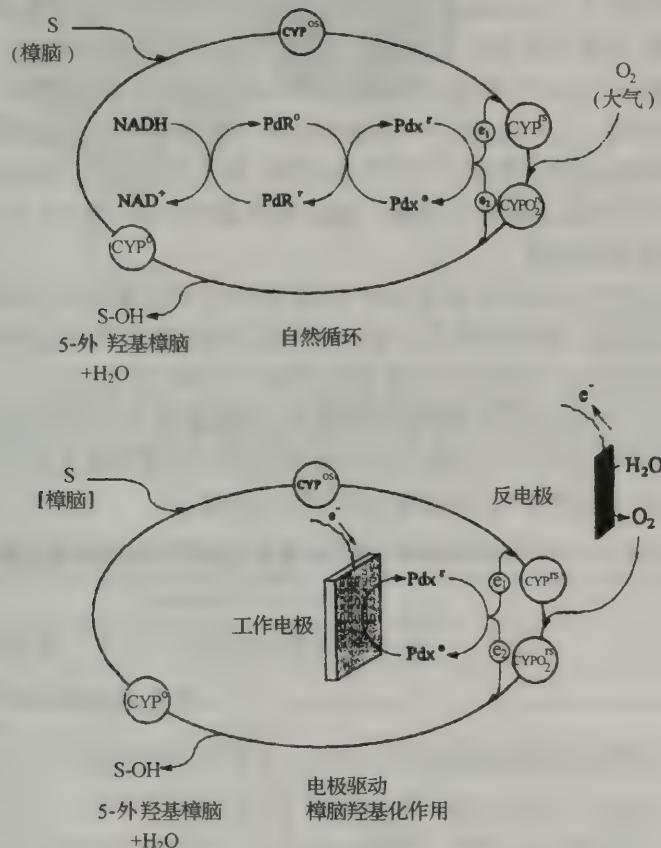


图 12.2 电极驱动樟脑的羟基化作用(Reipa *et al.*, 1997)

上述的这些研究表明了直接电化学驱动酶方法生成手性羟基化产物的可行性,应用这种工程氧化还原酶到一些相关系统,如甲烷单加氧酶,来自细菌或哺乳动物线粒体的细胞色素 P450 或相似的分子建构的双加氧酶(甲苯双加氧酶)可以产生配向性的或立体专一性的羟基化产物。在这种情况下,需要像假单孢氧还蛋白这样的双重功能的氧化还原蛋白,在催化循环中进行电子转移,或作为产物专一性和高转换率的效应因子。这种方法延伸应用到只有单一的还原酶氧化还原配体的微粒体、植物或酵母的 P450,还需要另一种电极或生物反应器调节还原酶配体蛋白直接还原(Reipa *et al.*, 1997)。

### 12.1.3 P450 的固定技术 (immobilization)

酶的固定有利于: ① 将生物催化剂与产物分开, ② 定位于反应器中, ③ 增高酶的稳定性和活性的保留时间, ④ 可能获得酶的超活性。Lamb 等(1998)将 polyaphron 用于 P450 固定化取得重要的进展。Polyaphron 是通过滴加含非离子表面活性剂 [1% (w/v) softanol 30] 的有机相于含另一非离子表面活性剂 [1% (w/v) synperonic A20] 的水溶液中而形成的, 可以稳定数月。Polyaphron 相均匀地分散于大量的水相中形成不连续微米大小的有机溶剂液滴, 被称为胶质体 aaphrons (colloidal liquid aaphrons, CLAs)。

将在大肠杆菌 (*E. coli*) 中表达的植物 P450 (CYP71B1) 及其还原酶 (CPR) 的融合蛋白 (CYP71B1:CPR) 混入 polyaphron 中, 配制成包含一定酶量的 polyaphron。融合蛋白固定在 CLA 上主要靠疏水相互作用。CYP71B1:CPR 的分子质量在 125kDa (P450 53kDa + CPR 72kDa) 可被引向 CLAs 的疏水表面。P450 作为膜结合酶, 相对非极性, 更有可能把自己与 CLA 的油水界面相连。

CLA 固定的 CYP71B1:CPR 表现出对 P450 模式底物红霉素 (erythromycin) 和除草剂 (绿麦隆) 的代谢活性。测定结果显示与从酵母或大肠杆菌异源表达的自由 CYP71B1:CPR 的活性相比, 固定的 CYP71B1:CPR 活性增加了 10 倍 (表 12.2)。

CLA 固定后 CYP71B1:CPR 表现出的超活性, 可能是由于 CYP71B1:CPR 复合物固定于 CLA 油/水界面引起的分子结构上的活化, 使底物分子更容易进入 P450 活性位点或与 P450 活性位点的亲和性更高, 这可能有利于电子传递。

表 12.2 植物 CYP71B1:还原酶融合体催化红霉素 N-脱甲基活性和绿麦隆代谢速率

化合物	活性/[nmol/(min·nmol)]		
	对照	未固定 (free)	固定 (immobilization)
红霉素	—	1.2±0.8	11.0±1.2
绿麦隆	—	0.9±0.7	10.2±1.5

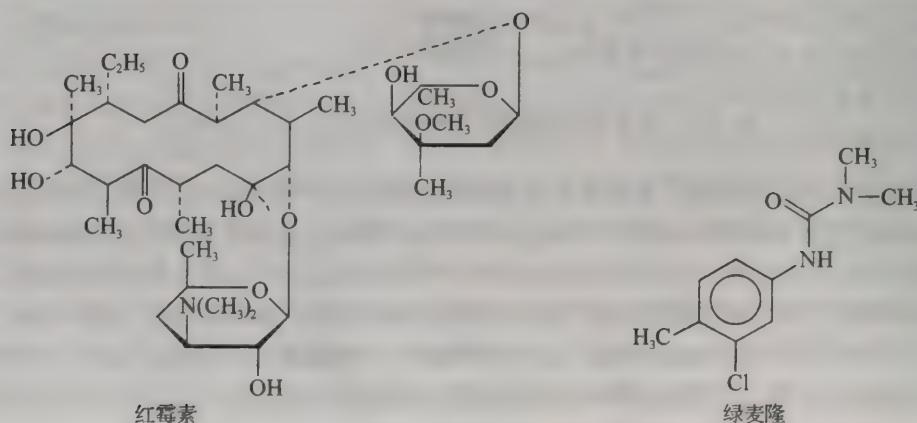


图 12.3 红霉素和绿麦隆的化学结构式

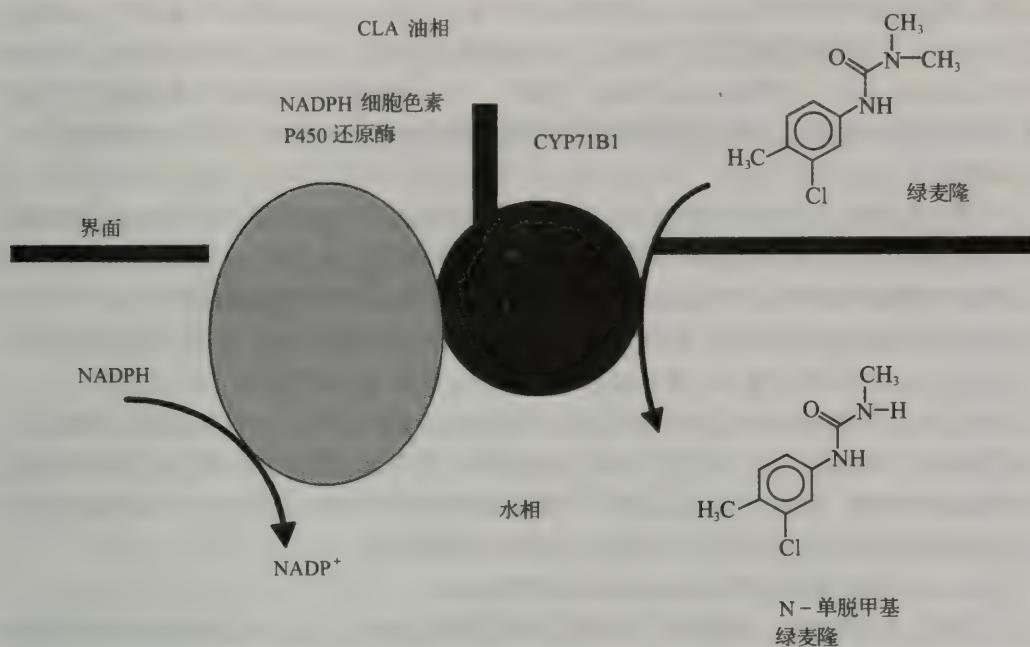


图 12.4 固定的植物 CYP71B1:还原酶融合体对绿麦隆 N-单脱甲基作用。绿麦隆分配至 CLA 油相,由此进入并结合经氧化的 P450 的疏水活性中心。

## 12.2 细胞色素 P450 的应用

### 12.2.1 细胞色素 P450 在医药工业中的应用

#### 12.2.1.1 异源表达系统的应用

为保证药物最大的治疗效果和安全,新药物先要用动物体或动物组织的离体系统作药物毒理学性质试验。除了考虑到伦理和经济问题外,以动物作模型的不足之处,部分还在于涉及药物代谢的酶的物种差异(Gonzalez, 1992)。因此,有必要建立基于以人组织为材料的试验系统,这将显著缩短药物开发与推向市场的周期(图 12.5)。

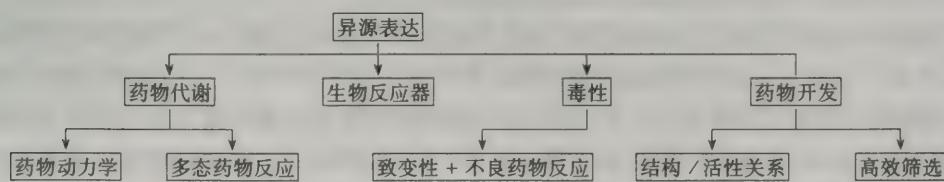


图 12.5 药物代谢酶重组体系的异源表达系统在药物开发和生物技术中的应用  
(Friedberg *et al.*, 1999)

人的药物代谢模型可以粗略地归为两类,一类是模拟整个药物代谢过程,另一类是模拟几步反应。第一类(复杂系统)包括人的肝细胞和肝癌细胞培养物。第二类(简单系统)

包括异源表达(体内和体外)以及从这些组织中纯化的酶。复杂模型的缺点在于药物代谢在各种情况下与肝相比都发生了改变,或由于培养条件变化,或由于生物型转化(肝癌细胞)(Lecluyse *et al.*, 1996; Maurel *et al.*, 1996)。而且这些模型不能用于调查特定同功酶在药物代谢中的作用,因为其他的药物代谢酶可能存在于肝细胞中,它们在药物代谢中也有作用。

简单模型在鉴定药物代谢的特定步骤及其涉及的酶中十分有用。而且这些系统还提供了预测药物-药物相互作用的手段。产生的重组酶可用于生产抗体,可以定量人组织中的药物代谢酶,使复杂系统可进行抗体抑制研究。综合有关特定酶在药物代谢中作用的信息,可以预测药物代谢多态性的后果。这也是因人调整临床药物处理方案所必需的。异源表达系统提供的大量异生素代谢酶也是蛋白结构研究的前提。

许多药物的药理学和毒理学特征是由细胞色素 P450 介导的代谢决定的。现在已有许多重组表达系统应用于研究人 P450 在这些反应中的作用,其中包括昆虫、细菌、酵母和哺乳动物模型。通常 P450 同工酶在不同模型中的催化性质是相似的。重组表达系统的选择要根据研究的目标以及不同表达系统的性质来考虑。

### (1) 人细胞色素 P450 的异源表达用作药学工具。

在许多类型的药物代谢酶中,P450 家族是主要的酶系,通常 P450 酶系涉及药物生物转化过程的限速步骤。大多数异生素的生物转化都是由于 CYP 的 1~3 家族成员的作用。其他 P450 一般起对内源分子的“管家”(housekeeping)作用(Gonzalez, 1989)。

肝 P450 的相对丰度已测定为:CYP1A2(13%), 2A6(4%), 2B6(1%), 2C(20%), 2D6(2%), 2E1(7%) 和 3A4(3%)(Shimada *et al.*, 1994; Rendic and Carlo, 1997)。各同工酶的相对丰度与活性随 CYP 的调控:如①诱导(CYP1A1/1A2, 2A6, 2E1, 2C 和 3A4),②抑制(全部)和③遗传多态性(CYP2A6, 2C9, 2C19 和 2D6)而变化(Rendic 和 Carlo, 1997),而 CYP 成分和活性的变异对于人对药物的反应有较大的影响,超过 90% 的药物氧化作用归功于 P450:1A2(4%), 2A6(2%), 2C9(10%), 2C19(2%), 2D6(30%), 3A4(50%)(Rendic and Carlo, 1997; Bertz and Cranneman, 1997)。

据调查,用于人的新的化学药物约 40% 的是由于产生严重的药物动力学问题而被取消(Prenois *et al.*, 1988)。这一结果促使人们在药物开发的早期阶段,要了解一些重要的药物动力学参数(如吸收和代谢)(Lin and Lu, 1997)。离体代谢方法现用于①确定候选药物(DC)的代谢稳定性,②鉴定涉及候选药物代谢的特异性酶,③评估候选药物对其他药物代谢的抑制和诱导效应(Parkinson, 1996)。

能将离体数据推导至人体内情况的模型一直是开发的目标,以提高模型的预测能力(Ito *et al.*, 1998)。如使用实验动物(大鼠、狗和兔)组织(肝切片 S-9 分级,微粒体或原代培养细胞)则受到因动物与人在 CYP 同工酶的调控和活性等方面存在的种间差异的限制(Boobis *et al.*, 1990)。现在提倡用人的组织,但人组织的可获得性和可变性是其限制因素,难以满足现在不断增多的候选药物代谢研究的需要。

分子生物技术的发展,可能克隆和异源表达人的细胞色素 P450 基因。与人肝微粒体有可比催化性质的 P450 酶已在大肠杆菌中表达(见第十一章)。这些酶可以大量生产以满足药物代谢研究自动化高效筛选的需要(Masimirembwa *et al.*, 1999)。Masimirembwa 等(1999)以含人还原酶基因酵母株宿主 INVS<sub>c</sub>-1HR, 以 pYeDP60 为

cDNA载体,建立了异源表达了人的9种P450的酵母系统。通过对该系统所表达的酶的米氏常数、底物特异性以及抑制剂——酶的选择性特征的测定,发现该系统与人肝微粒体以及其他重组体P450具有可比性。

选择酵母用于人P450的异源表达系统具有许多优点①操作简单,②无需cDNA修饰,可得到高产量的CYP稳定酶,③在酵母中存在内质网。虽然大肠杆菌系统易于培养和酶的提取也相对容易,但要有效表达先要对CYP的氨基酸末端进行修饰,且大肠杆菌缺乏内质网(Iwata *et al.*, 1998)。淋巴母细胞和HepG2细胞系统具有哺乳动物源的优势,但难以优化达到最大活性表达(Gonzalez and Korzekwa, 1995)。杆状病毒-昆虫细胞系统每克蛋白可以产生大量酶,但在技术上难度大,而且CYP是瞬时表达难以保持(Friedborg and Wolt, 1996)。

Masimirembwa等(1999)的表达系统,对CYP表达的产量为22~132pmols/mg微粒体蛋白,而在未用重组P450转化的酵母未检测出P450。可见组成型P450在酵母中非常少,共同表达的NADPH-P450还原酶活性平均为75nmol/(min·mg)。与肝微粒体相比(CYP=300pmol/mg,NADPH-还原酶=150nmols)(Pearce *et al.*, 1996),可以认为该系统中的P450还原酶不是P450活性的限制因素。用标志反应测定,表达的P450具有预期的底物特异性(Ona *et al.*, 1996),测得的米氏常数在文献报道的范围内。化学抑制剂对特定P450有显著选择性(Ona *et al.*, 1996)。

通过以上特征的测定,可以认为该异源表达系统可以得到无限的酶源,以满足自动化药物—药物相互作用高效筛选程序、鉴定药物代谢途径、确定各P450的结构/功能关系的需要,可更好地预测P450在药物代谢中的作用。

## (2) 细胞表达系统用作生物反应器

药物开发需要对药物代谢途径进行详细地鉴定,分析时需要鉴定代谢物的结构特征,同时需要制备标准物。为达到这个目的,中间物的量要达到毫克级,即使通过精心设计的化学合成方法也难以达到,但只要细胞系统表达高催化活性型酶,可用P450重组体膜蛋白就能理想地产生足够的P450代谢物。

Friebberg等(1999)报道,大肠杆菌比酵母更适合用作生物反应系统。大肠杆菌重组体膜蛋白CYP2D6和DYP3A4的表达活性[pmol/(min·mg)]是从酵母分离的膜活性的6和10倍。P450在大肠杆菌中的产量比酵母高50和100倍。当然在产生P450较高产量的生长条件下,酵母可以用作生物发酵器(biofermenter)(Pompon *et al.*, 1996)。

决定细胞系统大规模生产代谢物效率的重要因素是细胞膜的渗透性(permeability)。在表达CYP3A4的大肠杆菌DH5 $\alpha$ 完整细胞以及从这些细胞分离的膜的6 $\beta$ -羟基睾丸酮形成的时间曲线来看,完整细胞和膜的初始反应速率相似。完整细胞的代谢不需要加入NADPH,但在3h后,反应速率大幅下降,这时每纳摩尔(nmol)P450可以形成500nmol的6 $\beta$ -羟基睾酮,相当于每升培养物可以生产30mg的6 $\beta$ -羟基睾酮。用其他化合物如氯羟苯唑(chlorzoxazone)和硝苯地平为底物,P450介导的反应的线性范围一般也在2h。2h后底物的转换数下降的原因可能是NADPH已用尽。从Friedberg等(1999)及Parikh等(1997)报道的数据可以看出,表达功能P450加单氧酶的大肠杆菌系统,不久将以半制备的规模取代化学合成。将来随系统的进一步优化,适于大规模的生产代谢物,可用作药物生物合成过程中的中间产物。

酵母细胞表达系统用作生物反应的成功例子是酵母工程菌用于孕烯醇酮和孕酮合成。甾醇广泛用作药物,构成主要的抗炎、避孕和抗癌剂。在哺乳动物中,所有甾醇的生物合成的第一步(也是限速步骤)是胆固醇转化为孕烯醇酮(Lieberman and Prasad 1990)。这一反应是由线粒体的侧链断裂细胞色素 P450(P450scc)所催化,反应需要皮质铁氧还蛋白(ADX)和铁氧还蛋白还原酶(ADR)作为电子的载体(Miller, 1988)。在肾上腺皮质内质网孕烯醇酮被 $3\beta$ -羟基甾醇脱氢酶-异构酶( $3\beta$ -HSD)转化为孕酮(Penning, 1997),该反应为活性甾醇激素生物合成的第二个关键步骤。

甾醇的重要用途是使人们寻找甾醇合成的实用方法。结合化学合成和微生物生物转化、以胆固醇或植物甾醇为原材料的工业生产合成路线已建立(Woods, 1975; Mahato and Garai, 1997)。如能由简单碳源为原料,重现完整的甾醇合成途径,则是甾醇的生产工艺的大改进。Duport 等(1998)构建了一个酵母株,可由半乳糖生产孕烯醇酮和孕酮,即通过重组 FY1679-28C 酵母株共同表达拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的 $\Delta 7$ -甾醇还原酶( $\Delta 7$ -red),牛 P450scc、ADX、ADR 和人 $3\beta$ -HSD 以及破坏内源性麦角甾醇生物合成中的 $\Delta 22$ -甾醇脱氢酶活性,可高效地生物合成孕烯醇酮和孕酮,其中侧链断裂反应与酵母甾醇合成紧密偶联。

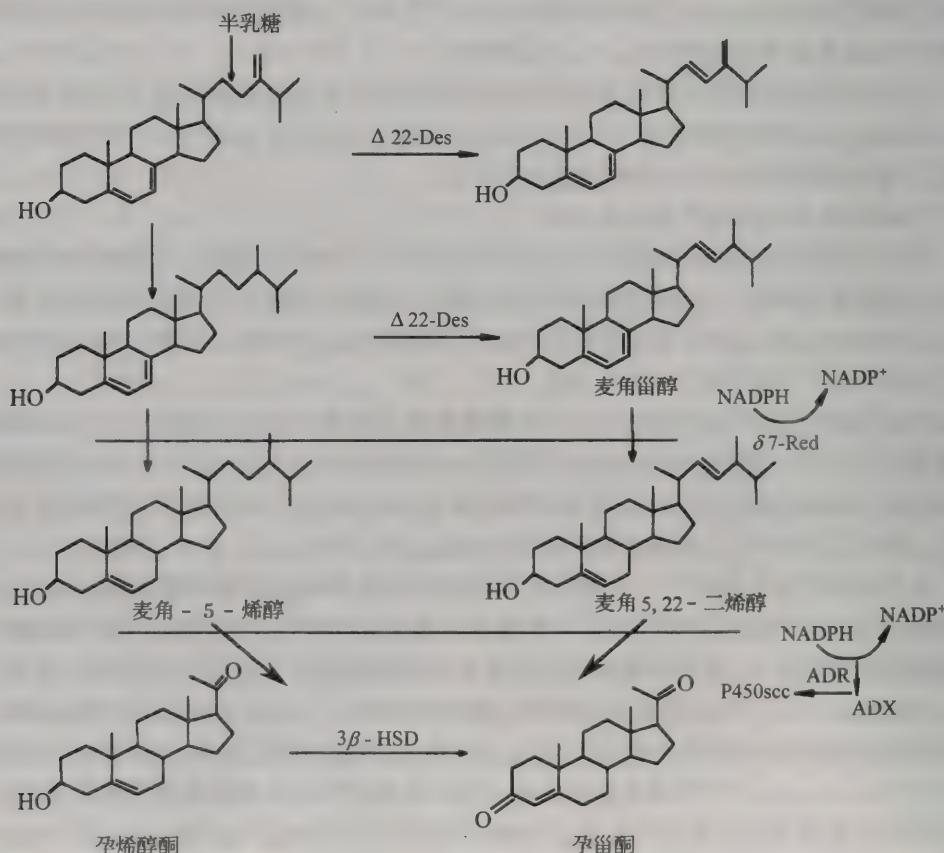


图 12.6 重组酵母株 FY1679-28C 中孕烯醇酮和孕酮的合成(Duport *et al.*, 1998)

### (3) 哺乳动物细胞系统用于调查毒理学问题

P450 控制着药物和环境污染物的毒性和解毒途径。考虑到哺乳动物细胞中响应毒效应的靶标结构在细菌或其他微生物中不存在或不相同,因此调查与人相关的毒性机制时,理想的模型为哺乳动物细胞系。为调查化疗药物长春花生物碱的毒性,表达人的 P450 酶的哺乳动物细胞系统发挥了重要的作用。

长春花生物碱已知与微管蛋白(tubulin)结合,由此抑制微管(microtubules)的组装。且已知长春花生物碱由位于肝微粒体的 CYP3A4 代谢。个体间 CYP3A4 的水平可能相差 10 倍,因此推测病人间对药物清除能力的不同是由于 P450 表达水平不同的结果(Zhou *et al.*, 1993),但至今尚不知是否因为 P450 介导的代谢改变了这些化合物的毒性。

表达人的不同 P450 同工酶的 CHO 细胞,已用于测定长春新碱(vincristine)的毒性。之所以利用哺乳动物细胞模型,是因为细菌中不存在微管,酵母微管的组成与哺乳动物细胞不同,这可能是长春花生物碱对酵母没有细胞毒性的原因。同时表达 CYP3A4 和 P450 还原酶的细胞系比母本细胞系以及仅表达 P450 还原酶的细胞,可以更好地保护细胞免遭长春新碱的毒效应。表达 CYP3A4 但不表达人 P450 还原酶的细胞系的保护效应较小。表达 CYP1A2、CYP2D6 或 P450 还原酶的细胞,并不降低长春新碱产生的细胞毒性。从试验数据可以得出 CYP3A4 参与长春花生物碱的解毒,这类药物可能导致特异体质毒性(Schuetz *et al.*, 1996; Murray *et al.*, 1997)。

P450 参与化疗药物的活化,形成具细胞毒性的代谢物,最典型的例子是环磷酰胺,它可被 CYP3A4 和 CYP2B6 活化(Chang *et al.*, 1993; Ren *et al.*, 1997)。另一类被 P450 活化的是阿霉素(doxorubicin)类似物如吗啉代阿霉素(morpholino-doxorubicin)(Lewis *et al.*, 1992)。用重组体细胞系,可以证明表达 CYP3A4 的细胞比亲本 CHO 细胞或表达人 P450 还原酶的细胞的敏感性高 1000 倍(Friedberg *et al.*, 1999)。

#### 12.2.1.2 细胞色素 P450 对癌症的基因治疗

传统的癌症治疗方法依赖手术、放疗和化疗,这些方法具有许多不利的方面如治疗的不完全、药物对宿主组织的毒性以及抗性肿瘤细胞亚种群的形成。因此,人们一直在寻找新的癌症治疗方法。近年来,一些根据基因治疗原理相继提出对癌症处置的不同方法。正在开发的癌症基因治疗方法包括:①肿瘤抑制基因(suppressor gene)取代及癌基因(oncogene)失活,②导入药物抗性基因以使病人能耐受更高浓度和效力更强的细胞毒性药物,③用细胞因子和淋巴细胞活素(lymphokines)加强机体对肿瘤的免疫反应以促进肿瘤的抑制作用,④肿瘤内表达可以生物活化癌化疗潜药的酶。上述方法④可以通过直接导入编码潜药(prodrug)活化酶的“化学致敏”(chemosensitization)或自杀(suicide)基因,以使靶标肿瘤细胞对于本来无活性的潜药敏感。以潜药活化为基础的癌症基因治疗方法是特别引人关注的一种方法,因为施用潜药不仅可以对表达潜药活化基因的细胞产生细胞毒性,还对其周围肿瘤细胞也可产生细胞毒性。这种效应称为“旁观者”(bystander)细胞毒性效应,其意义在于,即使一小部分肿瘤细胞转录了治疗基因就可以产生有效的化疗反应。相反,其他方法如肿瘤抑制基因取代或癌基因失活需要对各种瘤细胞进行基因修饰,这是现在基因运送(gene delivery)方法学中的一个难题(Waxman *et al.*, 1999)。以下介绍是基于潜药活化作用的癌症基因治疗,重点在 P450 引起的潜药活化及其应用的现状与进展。

现在研究用于癌症治疗的潜药活化基因主要包括:①单纯疱疹病毒胸腺激酶(herpes simplex virus thymidine kinase, HSV-TK),它活化抗病毒潜药 ganciclovir,②胞嘧啶脱氨酶(cytosine deaminase, CD),该酶是细菌基因编码,它可以通过转化癌症化疗药物 5-氟胞嘧啶(5-fluorocytosine)使这种抗侵染剂变成 5-氟尿嘧啶(fluorouracil),而使肿瘤细胞对 5-氟胞嘧啶更敏感。其他一些潜药活化酶系统的潜在应用研究也在开展,如细菌羧基肽酶 G<sub>2</sub>,可用于活化合成的芥类(mustard)潜药(通过切除谷氨酸分子,释放出细胞毒性的中间物);大肠杆菌硝基还原酶可以活化潜药 C131954 以及结构相关的芥类潜药类似物。这些方法的原理是用外源基因转入肿瘤细胞种群,使其具有对潜药活化的能力,而宿主细胞由于这一基因不表达,因此缺乏对潜药的化学敏感性。

虽然 ganciclovir/HSV-TK 和 5-氟胞嘧啶/CD 在临床前研究中显示出一定的前景,而且可能最终会应用于临床,但这些系统存在许多限制,已知包括①由于这些基因不是哺乳动物的,因此其基因产物可能产生免疫应答而干扰潜药的活化,②它们依赖的药物最初是开发用作抗病毒药物(加 ganciclovir)或抗真菌药物(加 5-氟胞嘧啶),其癌症化疗活性未经历临床试验,③HSV-TK 和 CD 基因治疗方法依赖于肿瘤细胞 DNA 的复制,④HSV-TK 的“旁观者”细胞毒性反应需要直接的细胞-细胞接触(Waxman *et al.*, 1999)。

受已知方法(系统)的限制,且欲达到有效、持久的临床反应效果需要采取联合化疗,所以开发一种替代的或互补的基于潜药活化的癌症基因治疗方法显得十分必要(Waxman *et al.*, 1999)。结合细胞色素 P450 基因与癌症化疗潜药(可通过 P450 催化的加单氧酶反应而活化)的方法已在开发,该方法的独特之处在于:①它利用哺乳动物潜药活化基因而非细菌或病毒的基因以使肿瘤细胞靶标敏感化,②它利用已用于癌症化疗、经验证后的潜药,而非新的潜药(新潜药需要临床前开发以及临床检验,且其最终治疗功效还未知)。

一些抗癌药物包括一些常规的化疗药物被 P450 酶系代谢,表现出对肿瘤细胞的细胞毒性(表 12.3)。如环磷酰胺,异环磷酰胺,甲苄肼(procarbazine)和氮烯咪胺(dacarbazine),它们需要特定 P450 酶系的代谢作用,产生的中间物具有抗癌活性。硫-TEPA,阿霉素(doxorubicin),依托泊苷(etoposide)和三苯氧胺(tamoxifen)本身具有抗癌活性,但通过 P450 代谢形成的具有细胞毒性的代谢物,抗癌活性可得到加强。还有一类抗癌药,经 P450 代谢后导致药物失活。

表 12.3 P450 酶系代谢的抗癌药物

A. 潜药,需要 P450 代谢活化	B. 非必需 P450 代谢,但可能加强活性	C. P450 代谢不加强,但可能使药物失活
环磷酰胺	硫-TEPA	替尼泊苷(teniposide)
异环磷酰胺	阿霉素	红豆杉醇 taxol(paclitaxel)
甲苄肼	依托泊苷(VP-16)	长春花生物碱(vinblastine, vincristine)
氮烯咪胺	三苯氧胺	氯己基亚硝基脲 chloroethyl nitrosoureas(CCNU)

环磷酰胺(CPA)及其异构体异环磷酰胺是广为使用的 oxazaphorine 类烷化剂潜药,可由肝 P450 酶催化活化(Sladek, 1988)。环磷酰胺和异环磷酰胺在肝中的初级 4-羟基化代谢物含量很高,初级 4-羟基化代谢物以及其他开环衍生物醛磷酰胺(aldophos-

phamide)在循环过程中分解形成的丙烯醛和磷酰胺芥类(phosphoramide mustard)是关键的治疗活性的细胞毒性代谢物。但磷酰胺芥类不能穿过细胞膜,因此仅有在肿瘤细胞内分解的 4-羟基环磷酰胺在抗癌活性中起作用。肝中药物代谢导致烷化代谢物高浓度地周身分布,不可避免地产生一些显著的副作用,包括心脏毒性、肾毒性、骨髓阻遏(marrow suppression)和神经毒性。最近的研究表明,克服这一制约可以通过将潜药活化 P450 基因定位于肿瘤细胞(图 12.7)。这一基因治疗方法的依据是人肿瘤具有很低或无内源性的生物活化 oxazaphosphorine 或许多其他抗癌潜药的能力。因此,通过转化 CYP2B1 于肿瘤细胞中可以使细胞产生对环磷酰胺和异环磷酰胺很高的敏感性(Weber and Waxman, 1993)。该基于 P450 的基因治疗方法显示出在脑瘤治疗中的应用价值(Wei *et al.*, 1994; Manome *et al.*, 1996)。转化 CYP2B1 的肿瘤细胞明显加强培养细胞以及活体肿瘤模型体系的化学敏感性(Chen and Waxman, 1995; Chen *et al.*, 1996)。

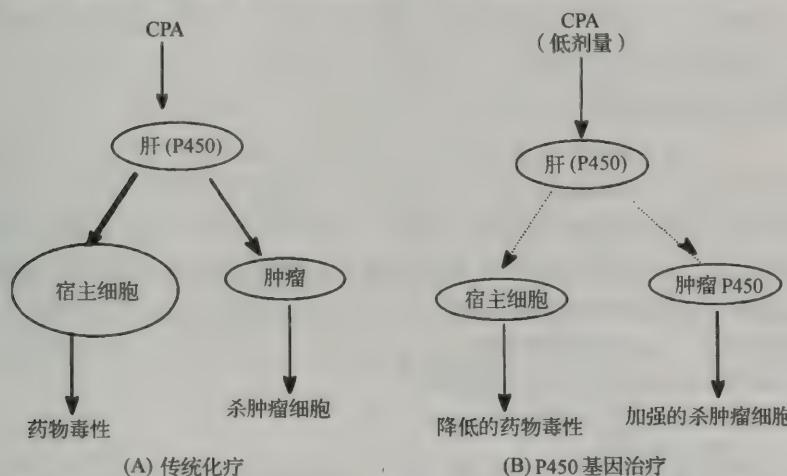


图 12.7 癌症传统化疗与 P450 基因治疗示意图(Waxman *et al.*, 1999)

用药物敏感基因如 CYP2B1 应用于癌症的基因治疗有两个基本的要求,即基因选择性转移到肿瘤上,且基因必须是有效的。反转录病毒(adenovirus)是一种有用的病毒介导的基因转移载体,它可以侵染许多类型的细胞包括处于分裂状态和非分裂状态的细胞,且病毒发生整合与插入突变的可能性小(Doerfler, 1996)。为评估“环磷酰胺/P450”潜药活化方法对其他肿瘤细胞型的适应程度,已构建一种带有 CYP2B1 基因、用巨细胞病毒(cytomegalovirus, CMV)启动子驱动的复制缺陷型重组体反转录病毒,并用于侵染人的肿瘤细胞系。反转录病毒—CYP2B1 的侵染,导致提高了几种人肿瘤细胞类型对环磷酰胺和异环磷酰胺细胞毒性,包括乳腺神经胶质瘤和前列腺癌细胞(Chen *et al.*, 1996)。因此,反转录病毒可能是一种有效通用的药物活化 P450 基因转导的载体。

由一些模型系统显示,P450 潜药活化系统具有很广阔前景,但为满足癌症病人临上有效、持久反应的需要,还需进一步加强系统的活性。根据 P450 酶系的性质,以下两点还需加强:①P450 代谢药物和其他外来物质包括癌症化疗药物的速率较低,一般仅为  $10\sim30/\text{min}(\text{mol 代谢物}/\text{mol P450})$ ;②P450 酶系代谢这些化疗药物的  $K_m$  值一般较高,在血浆中药物的浓度一般在  $\mu\text{mol}$  级。因此,以上提到的方法对药物的活化水平低,且

底物也不饱和。另外,由于 P450 在肝组织中表达非常高大部分药物在肝中被降解,仅有极少剂量的施用药物通过肿瘤细胞 P450 基因的表达产物代谢(Chen and Waxman, 1995)。

所有微粒体 P450 药物代谢反应需要两个蛋白成分,含血红素的 P450 蛋白和黄素蛋白。在以上的讨论中表明,在无 P450 还原酶的共同运送时,“P450/环磷酰胺”系统基因治疗是有效的。但最近发现,P450 还原酶的加入可显著地加强“P450/环磷酰胺”基因治疗的效果(Chen *et al.*, 1997)。增强化学致敏是由于 P450 代谢活性的增强,而 P450 代谢活性又直接与 P450 还原酶表达水平相关(表 12.4)。

表 12.4 P450 还原酶超量表达的细胞系

9L 细胞系	P450 还原酶活性 a	增加倍数	P450 活性 b	P450 相对活性
9L	57 ± 10	= 1.0	< 5	
9L/2B1	59 ± 9	1.0	29	= 1.0
9L/2B1/PR5	70 ± 6	1.2	42	1.4
9L/2B1/PR4	83 ± 5	1.5	37	1.3
9L/2B1/PR1	130 ± 5	2.3	49	1.7
9L/2B1/PR6	248 ± 12	4.4	81	2.8
9L/2B1/PR11	295 ± 10	5.2	73	2.5
9L/2B1/PR7	309 ± 10	5.4	92	3.2

注:a:nmol 细胞色素 C 被还原/(min·mg)微粒体蛋白;

b:pmol/(min·mg) 7-乙氧香豆素为底物;

PR:指表达 P450 和超量表达 P450 还原酶的细胞系;

大鼠 9L 胶质肉瘤(gliosarcoma)模型(Chen *et al.*, 1997)。

P450 还原酶的增效作用不仅在大鼠 P450 CYP2B1 中可见,也见于人的 P450 基因如 CYP2B6, CYP2C18(Nelson *et al.*, 1996)。由此 P450 还原酶基因运送可能有效加强转染 P450 基因的肿瘤细胞对药物的敏感性,这一假设在反转录病毒指导的 P450 基因运送研究中得到证实(Jounaidi *et al.*, 1998)。

表达治疗用 P450 基因的肿瘤细胞可被 P450 还原酶基因运送进一步化学敏化的发现具有重要意义。首先,P450 还原酶在某肿瘤靶标中的活性是 P450 基因治疗有效性的决定因素。具有低或中等内源性 P450 还原酶活性的肿瘤细胞的基因治疗,导入 P450 是一个主要的目标。对某些内源性 P450 还原酶表达较高的肿瘤,加入 P450 还原酶也可望进一步加强的治疗效果。以往的研究指出,在某些特定的环境下(如去除垂体激素导致的甲状腺机能减退),P450 还原酶是 P450 催化的肝氧化代谢速率的限制因素(Waxman *et al.*, 1989)。在已知转染 P450 的肿瘤细胞中,P450 蛋白的表达水平很低,P450 还原酶/P450 的比率要比肝高得多,然而,通过 P450 还原酶的基因运送,P450 的催化活性仍可得到增强,由此增强了环磷酰胺的化学敏感性,表现在产生的代谢物 4-羟基环磷酰胺增加、共培养的母本 9L 肿瘤细胞“旁观者”致死的增强、残留的“旁观者”肿瘤细胞在联合表达 P450 与 P450 还原酶的处理中明显减少。与“HSV-TK/ganciclovir”基因治疗方案不同,P450 与环磷酰胺不需要 P450 表达的肿瘤细胞与非 P450 表达的肿瘤细胞直接接触就可以发生“旁观者”效应,因此,只要有少部分的肿瘤细胞被 P450 基因转导,就可以有效地

局部杀死肿瘤细胞。既然 P450 还原酶的活性是肿瘤细胞对依赖 P450 的化疗药物活性作用的决定因子, 调控肿瘤内源性 P450 还原酶水平和 P450 还原酶基因表达的因子可能是 P450 介导药物活化的调节剂, 包括甲状腺激素(在几种组织中, 为 P450 还原酶的完全表达所需)、药物和其他异生素(可以诱导 P450 还原酶基因表达)。

除 CYP2B1 外, 其他 P450 基因如来源不是大鼠的 CYP2B 家族基因(人 CYP2B6, 兔 CYP2B4, CYP2B5, 狗 CYP2B11), 以及其他家族如 CYP2C 和 CYP3A P450 基因也活化环磷酰胺和异环磷酰胺, 也可用于癌症的基因治疗(Jounaidi *et al.*, 1998)。

潜药活化 P450 基因的表达和有效运送可以用一些改良修饰的病毒载体, 包括传统的反转录病毒、腺病毒(adenovirus)、单纯疱疹病毒(herpes simplex virus)以及腺病毒相关的病毒(adeno-associated virus)。非病毒载体包括阳离子脂质体, DNA-蛋白复合物, 非病毒 T7 的同型载体以及其他方法(Pawelek *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 1998)。对于 P450 和 P450 还原酶, 基因运送的进一步加强可以通过用内部核糖体进入位点序列(internal ribosome entry site sequence, IRES)联结这些基因以使它们在双顺反子信使(bicistronic message)上协同表达。或者, 构建一个编码有催化活性 P450-P450 还原酶融合蛋白的融合基因以高效表达 P450 活性(Fiske *et al.*, 1996; Shet *et al.*, 1993)。

为了发挥 P450 基因治疗的高效性和选择性, 用 P450(和 P450 还原酶)基因治疗必须以高度的定向特异性运送到肿瘤细胞中。尽管反转录病毒载体发挥一定程度的肿瘤特异性(具选择性转导分裂态细胞的性质), 但仍需附加控制以达到高度靶向特异性的要求。有一种定向表达的方法是利用肿瘤特异性或肿瘤选择性的 DNA 加强子(enhaner)序列, 在肿瘤细胞中选择性活化转导治疗用基因的表达(图 12.8), 如来自编码酪氨酸酶基因的

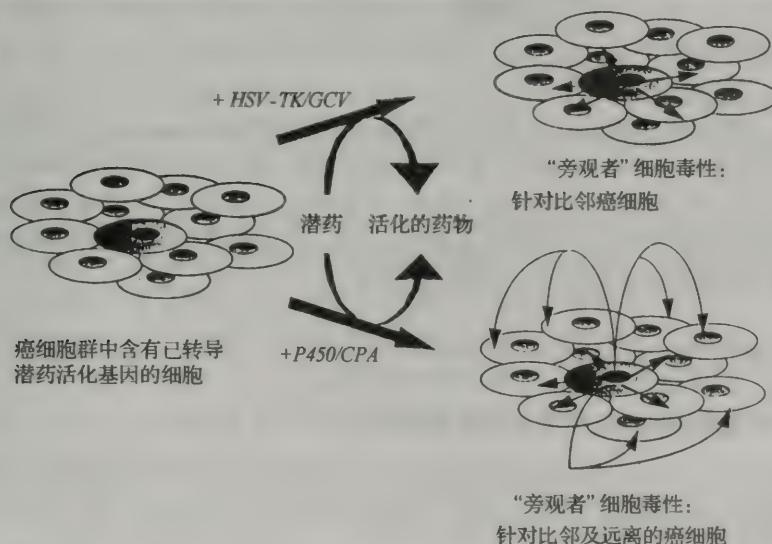


图 12.8 HSV-TK/ganciclovir 与 P450/环磷酰胺“旁观者”细胞毒性的比较, 运用现有技术, 恶性肿瘤中仅有部分细胞可能表达某癌症治疗基因。阴影部分为被潜药活化基因(HSV-TK 或 P450)转导的肿瘤细胞, 用 ganciclovir(GCV)处理导致潜药活化, 伴随“旁观者”效应, 但这种效应仅限于与 HSV-TK 表达的肿瘤细胞直接接触的细胞(上), 相反, 环磷酰胺(CPA)处理经用 P450 基因转化的肿瘤细胞导致可扩散的具细胞毒性的代谢物的形成, 这造成“旁观者”细胞毒性不需直接的细胞接触(下)(Waxman *et al.*, 1999)。

DNA 加强子(靶向黑素瘤),ERBB2(靶向胰癌),癌胚抗原(arcinoembryonic antigen)(靶向肺癌),DF3/MuCl(靶向乳腺癌), $\alpha$ -胎蛋白(fetoprotein)(靶向肝癌)。调节转录和其他调控 P450 和 P450 还原酶基因表达的人工的基因调节系统也可能有一定意义。还有一种可能性是利用由肿瘤特异性的条件和因子控制的 DNA 调节元件来调控。将来 P450 基因治疗的研究方向,将是基因治疗的临床评价以及为加强酶活性、肿瘤细胞化学敏感性和 P450/P450 还原酶基因定向特异性提供方法。

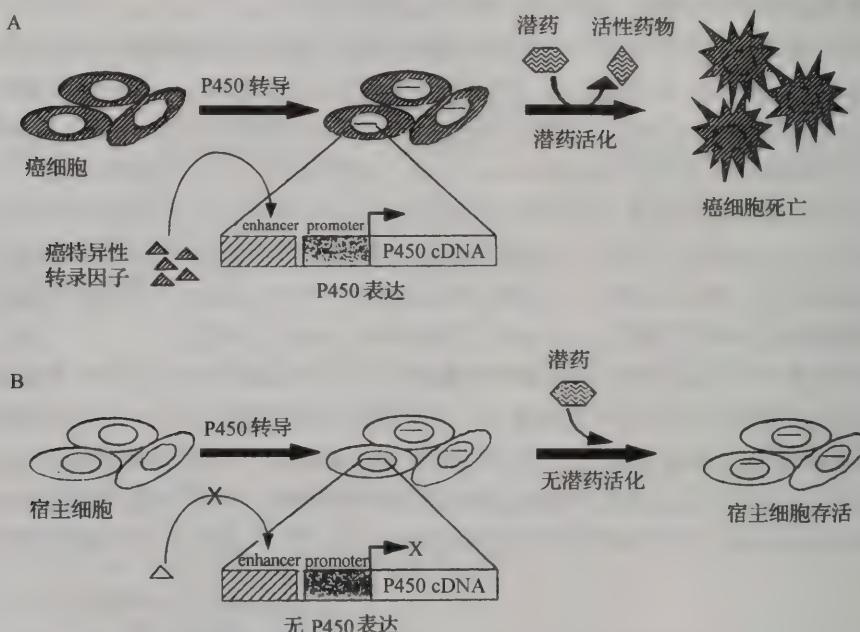


图 12.9 用肿瘤特异性的 DNA 加强子元件以实现转录定位(Waxman et al., 1999)。在肿瘤特异性的 DNA 加强子的控制下,将治疗用的 P450 基因转化肿瘤细胞。用与加强子同源的肿瘤特异性的转录因子使加强子活化,由此导致 P450cDNA 高效转录、P450 表达、潜药活化以及肿瘤细胞死亡(A)。相反,在无或少肿瘤特异性的转录因子的宿主细胞(B),P450 基因的转化不导致 P450 蛋白的明显表达,缺乏 P450 催化的潜药活化,转化的宿主细胞仍然存活。

## 12.2.2 P450 在农业中的应用

### 12.2.2.1 细胞色素 P450 在害虫治理的应用

许多害虫产生对杀虫剂的抗性是因为 P450 催化的杀虫剂代谢解毒作用增强,因此 P450 的抑制剂是杀虫剂的有效增效剂。成功的抑制剂包括增效醚、增效菊(sesame)、亚砜、茴萝油(dillapiole)、芝麻素(sesamine)、MGK264 等。PBO 是最为人熟知的增效剂。在抗性家蝇中,它对拟除虫菊酯类农药的增效比率达 300~923 倍。在澳大利亚,已用 PBO 加在拟除虫菊酯中更好地控制抗性棉铃虫。一些 P450 同工酶的特异性抑制剂已被鉴定,CYP6D1 是家蝇对拟除虫菊酯产生抗性的 P450,它可以被花椒毒素,氯吡磷(chlorpyrifos), $\beta$ -萘黄酮,PBO 以及 5-甲氧基补骨脂素强烈抑制。CYP6D1 的高选择性抑制化

合物包括 5-甲氧基补骨脂素、花椒毒素、 $\beta$ -萘黄酮、氧氯吡磷异黄樟素(isosafrole)和补骨脂素等。异黄樟素可能成为家蝇成虫对拟除虫菊酯杀虫剂的强增效剂(Scott, 1996)。

已知许多来源于昆虫或其他生物的 P450 具有对杀虫剂的解毒能力,因此如将这些 P450 的转入到天敌昆虫中,可望提高寄生蜂等天敌昆虫对农药的抗性,有助于害虫的生物防治。

### 12.2.2.2 转 P450 基因植物

通过转基因方法可以培育出具有特异性质的植物,达到改良作物品质(木质素,去除不良成分,改变花色及形状)、提高植物抗性(病、虫、除草剂)和实现生物除污的目的。

生氰糖苷广泛分布于植物界中,在昆虫中也存在。其合成过程已在第七章叙述,从 L-酪氨酸至蜀黍氰苷生物转化仅需 2 个 P450 催化。从高粱中分离鉴定了参与生氰糖苷(蜀黍氰苷)合成的 P450 CYP79, CYP71E1(Bak *et al.*, 1998)。生氰糖苷的功能被认为是防御害虫和草食者(Nahrstedt, 1985)。因此人们可以将蜀黍氰苷代谢有关的基因如 CYP71E1 导入非生氰糖苷植物,以加强植物的抗性。

有些植物如木薯块茎中含有生氰糖苷,对以木薯块茎作为主食的人来说是有害的(Rosling, 1988),因此在食用前要先预处理加工。如从一些农业上重要的生氰糖苷作物如木薯中分离同源 cDNA,通过调控生氰糖苷的含量以优化食物安全和产生对有害生物的抗性。

Jung 等(2000),从大豆中分离了编码异黄酮合酶的基因,将该基因在拟南芥中表达,可以在非豆科植物中产生 5,7,4'-三羟基异黄酮。因此可以通过控制异黄酮合酶基因的表达以达到农业和营养方面的目标。

木质素(lignin)是一类交联的苯丙烷类多聚体。气管组织的细胞壁的硬化,木质素是必要的,木质化的气管可以使植物抵抗蒸腾作用产生的压力。木质素使生长在富含寄生和腐生生物环境的木材植物具有抗腐烂的能力,它在非木材植物中与病原菌攻击的响应有关。

对于人类来说,木质素也有其重要意义,首先它限制了我们使用农业和林业中的木质纤维素材料。因为它限制了消化道水解酶接触细胞壁中的多糖,木质素降低了饲料的营养价值。但在造纸工业的浆化过程中要从木料中先除去木质素。

木质素前体是通过 L-苯丙氨酸由苯丙烷途径产生的阿魏酸和芥子酸,分别合成邻甲氧基(guaiacyl-)和丁香基(syringyl-)取代的木质素单体。在被子植物中,木质素的生物合成需要至少两个 P450 的活性,即肉桂酸-4-羟化酶(C4H)和阿魏酸-5-羟化酶(F5H),但丁香基单体的合成仅需 F5H。

植物控制木质素单体组成具有极大的意义,它可以影响在工业制浆中木质素降解的容易程度,也影响饲料的可消化程度。如果通过生物技术手段,能对木质素单体组成进行控制的话,则纸浆生产的费用可以大幅下降,动物原料也因其营养价值增加而升值。

Meyer 等(1998)以 *Arabidopsis* 作为模型系统,用转基因的方法以内源性启动子(C4H 基因的启动子)作为启动子,培育的转 F5H 基因的 *Arabidopsis* 累积丁香基单体十分丰富的木质素,这种类型的木质素在自然界中十分罕见。因此,提高作物和树木中丁香基含量可能产生易于消化或提取的木质素。

### 12.2.2.3 P450 基因在花卉工业中的应用

20世纪以来,花卉业逐渐成为具有很高经济效益的行业。花卉最发达的荷兰,在1993年一年的插花出口的价值就达137.51亿荷兰盾。全世界花卉每年的销售额已达1亿美元。长期以来,花卉培育的一个主要目标是改进花卉外观及延长花卉的保存时间。随着人们对花瓣显色分子基础的了解以及基因资源的不断发掘,人们利用基因工程培育出了许多传统的园艺技术难以获得的新品种(瞿礼嘉 *et al.*, 1998)。

#### (1) 利用基因工程改变花卉颜色

植物的花色是由植物代谢过程中能够合成哪些花色决定的,植物紫色和蓝色的花中,通常包含花翠素(delphinidin)衍生物,红色和粉色的花中通常包含花青素(cyanidin)或天葵素(pelargonidin)的衍生物。这三类色素物质的差别在于它的 $\beta$ -环被羟基化的程度和羟基化的位置不同。羟基化程度增加,花色就越蓝。这些羟基化作用由类黄酮3'-羟化酶和类黄酮3',5'-羟化酶控制(Holton *et al.*, 1993)。

传统培养的主要插花品种玫瑰、菊花和康乃馨有多种花色,但却无法培养出由花翠素衍生的色素形成的蓝色(Mol *et al.*, 1999)。Holton等(1993)报道了从矮牵牛(petunia)中分离了两个基因 *Hf1* 和 *Hf2*,这些基因编码膜结合的细胞色素 P450,具有类黄酮3',5'-羟化酶的活性,使花色素苷 $\beta$ -环发生了3',5'-羟基化,使花色蓝化(Mol *et al.*, 1999; Holton *et al.*, 1993)。

最近从矮牵牛中分离出一个编码细胞色素 b<sub>5</sub>(CYPb5)基因(De Vetten *et al.*, 1999),最初该基因被定为 *DifF*(Kroon *et al.*, 1994), *DifF* 编码 149 个氨基酸的蛋白,代表一类新的细胞色素 b<sub>5</sub>。 *DifF* 失活导致 F3',5'H 活性的降低,花瓣中 5'-羟基化花色素苷的积累也减少。该 CYPb5 表现出严格的特异性,既不影响花色素苷被 F3',5'H 类黄酮3'-羟化酶的3'-羟基化作用,也不影响苯丙烷代谢途径中另一 P450 肉桂酸 4-羟化酶的活性。体外试验研究也表明 P450 活性可被 CYPb5 调节。有些研究已观察到 CYPb5 显著增强 CYP450 的活性(Yamazaki *et al.*, 1997; Auchus *et al.*, 1998)。对于矮牵牛,为获得大量产生的3',5'-羟基化花色素,可能需要特异性的 P450 和 CYPb5,以及非特异性的 NADPH-CYP450 还原酶共同起作用(Mol *et al.*, 1999)。

将 F3',5'H 和 *Dfr* 基因转入白花康乃馨中表达后,可以产生翠雀素。现在已得到两个转基因株系,分别为浅紫红色的 Moondust<sup>TM</sup> 和深紫红色的 Maonshadow<sup>TM</sup>,它们整体上表现为紫红,但着色程度有所不同。

上面提到的 *Dfr* 基因,编码二氢黄酮醇 4-还原酶。来自矮牵牛的 DFR 不能转化二氢堪非醇这种合成天竺葵色素所需的底物,这就是矮牵牛中未发现有橙色色素的原因。在矮牵牛导入玉米的 DFR,在 10 年前培育出了橙色矮牵牛,这是第一个用基因技术改变花色的产品(Mol *et al.*, 1999)。

#### (2) 植物叶片和花的形态设计

植物叶片是植物生物产量的重要组成部分,它是花器官如花瓣的基础。因此利用分子技术对叶片或花器官的形状进行生物设计,对于作物和其他经济植物的改良有重要意义(Kim *et al.*, 1999)。

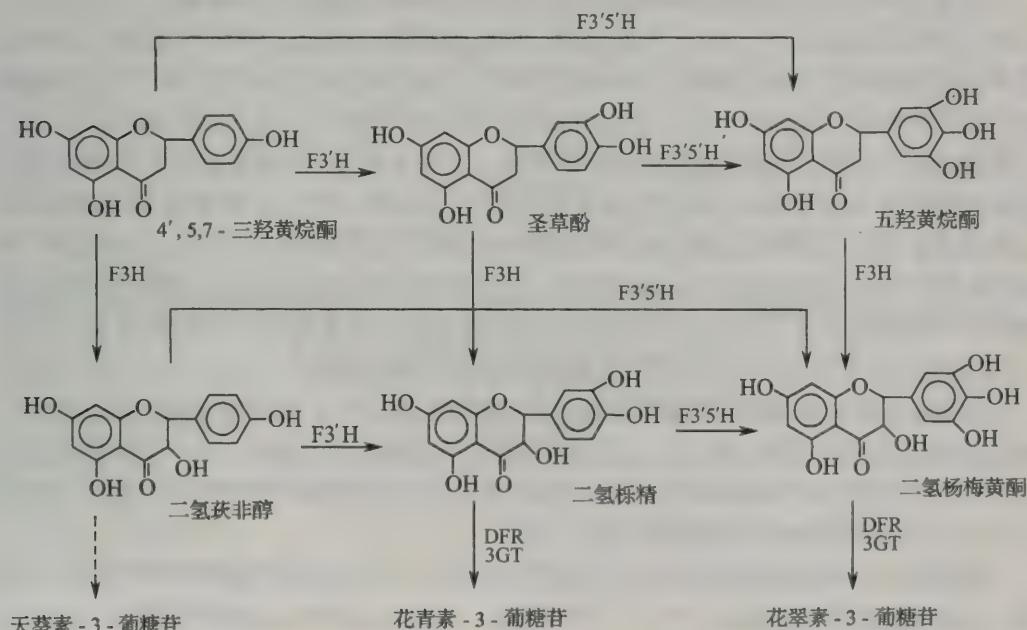
要对叶片形状进行生物设计,需要了解叶片形态发生的遗传机制。由于花器官也是

由叶片演化而来,因此对叶片形态遗传控制的了解有助于花器官的生物设计。由于叶的发育机制很复杂,现在对叶片发生的了解还不够。

对拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的研究发现叶的两向扩展是通过细胞的极化延伸调控(Kim *et al.*, 1998; Tsuge *et al.*, 1996)。该植物的 *rot3-1* 基因缺失突变体,表现出叶细胞极向延伸的特异性缺陷,其叶片比野生型短,但叶片宽度正常(Tsuge *et al.*, 1996)。分析 *Rot3* 基因的核酸序列发现,该基因编码的是 P450,命名为 CYP90C1,它可能参与甾醇的生物合成。该基因的转录物无所不在,但其功能特异性表现为控制叶细胞的极向延伸,推测该基因为叶片生长和发育的关键因子(Kim *et al.*, 1998)。

将野生型 *Rot3* 基因转入 *rot3-1* 植物,得到的转基因植物比 *rot3-1* 突变体具有更长的叶片,叶片和叶柄长度分别是突变体的 1.2~1.6 倍和 2.2~3 倍,但叶片宽度无显著改变。转基因植物的花器官的纵向延伸加强,而在 *rot3-1* 突变型的花瓣(petal)、萼片(sepal)、雄蕊(stamens)和雌蕊(pistils)长度减少。转基因植物的节间(internode)和下胚轴(hypocotyl)不受转基因诱导影响。以上例子说明 *Rot3* 基因特异性参与了叶和叶源器官(leaf-based organs)的延伸。

*Rot3-2* 是 *rot* 基因的等位突变(点突变, Gly-80→Glu),其表现为叶片宽度加大,节间和叶柄变短。将这突变体在 *rot3-1* 亲本中表达,植株叶片宽度加大,叶柄不变。转基因植物与野生植物和 *rot3-1* 植物具有相同长度的节间,但前者节间厚度是后者的 1.5 倍。



①F3H:黄烷酮 3-羟化酶, F3'H:类黄酮 3'-羟化酶, F3'5'H:类黄酮 3',5'-羟化酶,

DFR:二氢黄酮醇-4-还原酶, 3GT:UDP-葡萄糖类黄酮 3-O-葡萄糖基转移酶

②矮牵牛中,由于 DFR 底物特异性,不能产生天葵素衍生物。

### 12.2.2.4 抗除草剂的转基因植物

植物细胞色素 P450 在除草剂选择性和抗性中发挥重要的作用。在植物中已克隆鉴定了几种 P450(CYP71A10, CYP71A11, CYP73A1, CYP76B1, CYP81B1, CYP81B2)表现出除草剂的代谢活性。在哺乳动物肝及昆虫的微粒体中也发现许多具有催化除草剂代谢解毒的 P450(Ohkawa *et al.*, 1998)。因此,将这些基因转入到植物体中,可望培育出有代谢外源物质的转基因植物,以增强作物抗性,降低农药残留,甚至可用于植物净化(phytoremediation)。

#### (1) 转基因(大鼠 CYP1A1)烟草

在烟草中转入大鼠 CYP1A1 cDNA 以及大鼠 CYP1A1/酵母 P450 还原酶融合酶基因,表达出定位于微粒体的相应酶。离体试验表明转基因植物比对照表达出更高的 7-2 氧香豆素活性,并对绿麦隆产生抗性(Shiota *et al.*, 1996)。转基因植物具有与对照相同的吸收营养液中<sup>14</sup>C-绿麦隆的能力,但对绿麦隆的代谢速率要比对照植物快。绿麦隆代谢是通过环-甲基羟基化和 N-脱甲基作用。环-甲基羟基化作用的加强是转基因植物对除草剂抗性的原因。这些转基因植物表现出对阿特拉津(AT)和 pyriminobac-methyl PM 等除草剂的抗性,即单一 P450/CYP1A1 在植物中表达可能产生对不同除草剂的交互抗性(Inui *et al.*, 1998)。

#### (2) 转基因(人类 CYP1A1)马铃薯

日本 Kobe 大学的 Ohkawa 研究室将人的 CYP1A1 基因转入马铃薯中(Inui *et al.*, 1999),获得了表达人类 CYP1A1 的 S1384 和表达人类 CYP1A1/酵母 NADPH-细胞色素 P450 还原酶(YR)融合酶的 F1386 和 F1515。转基因植物 S1384 和 F1515 可以分别表达产出 CYP1A1 和其融合蛋白。离体分析显示,转基因植物 S1384, F1386 和 F1515 的 7-乙氧香豆素 O-脱乙基作用是对照植物的 3.5, 4.2, 3.8 倍,[<sup>14</sup>C]绿麦隆(CT)体内代谢活性是对照的 6.4, 5.8 和 5.3 倍之间无显著的差异,这表明 CYP1A1 的单独表达对转基因马铃薯是合适的,无需表达融合酶。转基因植物 S1384 表现出对 AT 和 PM 的耐受性,而 S1386 和 F1515 仅表现出对 PM 的耐受性,但对照植物经 AT 和 PM 处理后均致死。这些结果表明表达人类 CYP1A1 的植物可以代谢结构和除草机制不同的除草剂(CT 和 AT),由此产生了对 CT、AT 以及 PM 等除草剂的交叉耐受性。

S1384 植物对除草剂的代谢主要通过环-甲基羟基化和 N-脱甲基作用(图 12.10A),部分植物毒性的中间物 DM(图 12.10)在 S1384 植物中比对照少。DM 可能进一步在 S1384 中被代谢形成无植物毒性的中间体如 DMOH 和与葡萄糖的结合物,这些结果与表达大鼠 CYP1A1 的转基因马铃薯相一致。

转基因 S1384 植物对除草剂 AT 的耐受性是因为双脱烷基代谢中间物 DIDE 的积累。从图 12.10B 可以看到,[<sup>14</sup>C]AT 产生 DIDE 是通过脱丙烷作用后再经脱乙基作用,S1384 产生的 DIDE 是对照的 5 倍,而 F1386 与对照相同。因此,S1384 表现出的对 AT 耐受性比 F1386 和 F1515 高,可能是由于形成 DIDE 的能力更强的缘故。

#### (3) 转基因(大豆 CYP71A10)烟草

从大豆中克隆的 CYP71A10 基因转入烟草中,用剪叶片作的体内实验表明,转 71A10 基因的烟草对 4 种除草剂的代谢比对照植物更强(表 12.5)。由于 71A10 介导的

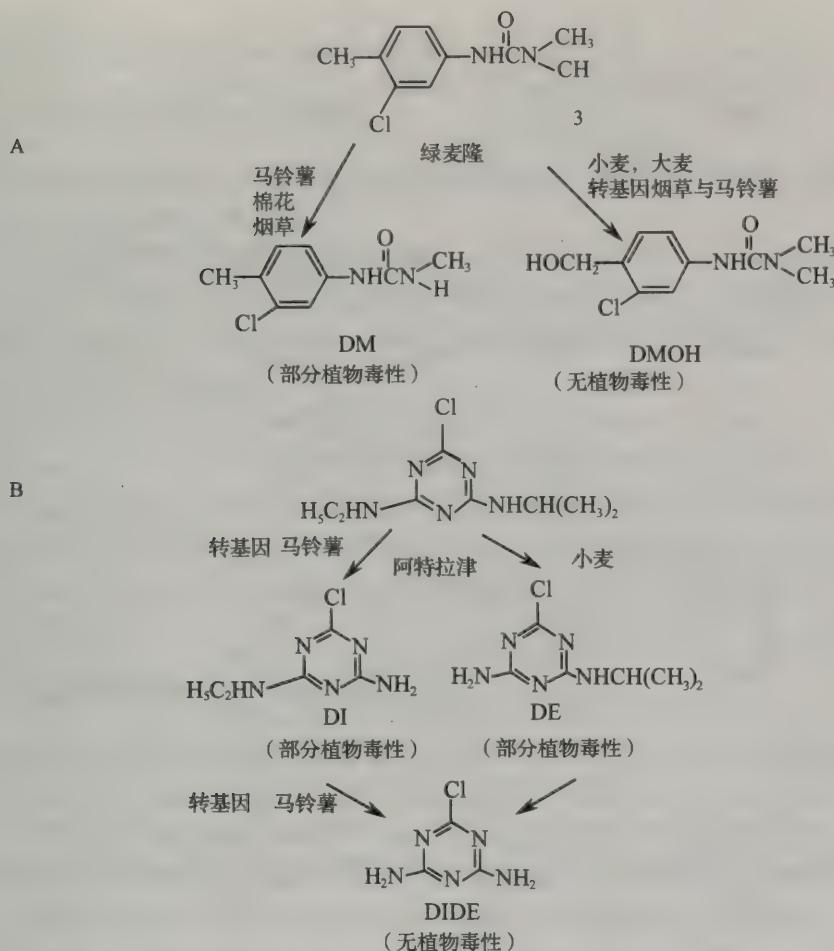


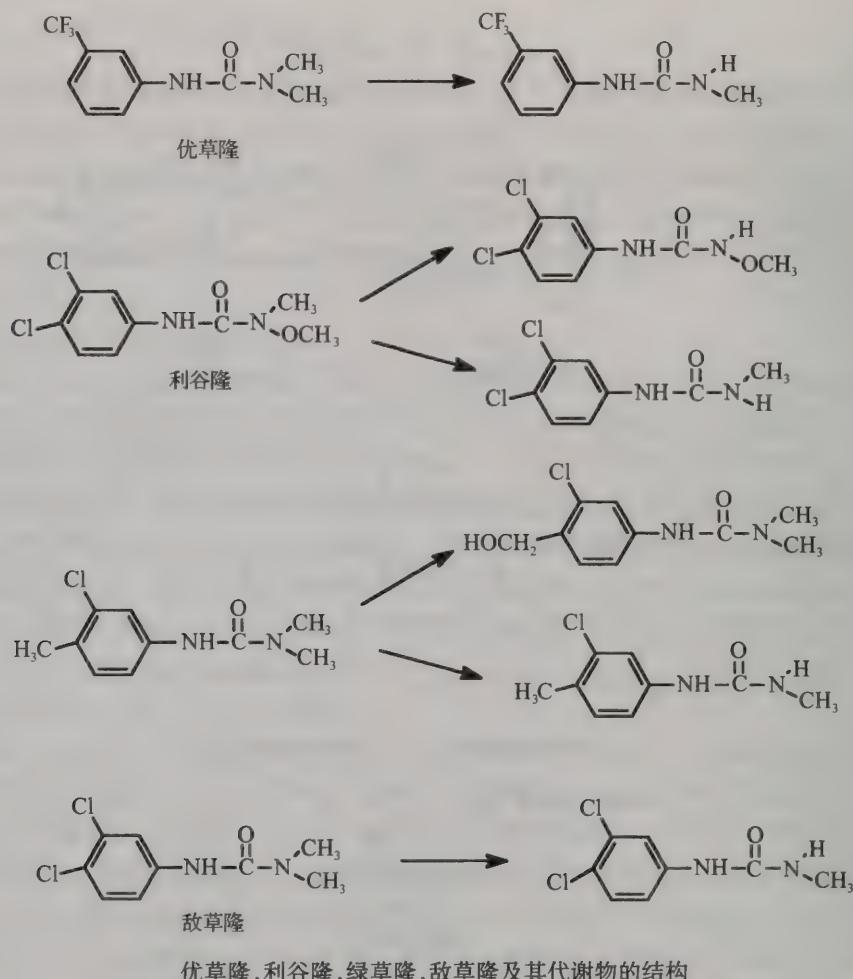
图 12.10 高等植物中绿麦隆(A)和阿特拉津(B)的主要代谢途径

除草剂代谢,转基因植物明显增强对利谷隆和绿麦隆的抗性(Siminovsky *et al.*, 1999)。

表 12.5 苯基脲除草剂代谢剪叶 12h 后测定

除草剂	代谢(%) (X + SE)	
	CYP71A10 转化	对照
优草隆 fluometuron	91(4.5)	15(0.6)
利谷隆 linuron	87(2.0)	12(2.6)
绿麦隆 chlortoluron	85(2.0)	39(7.5)
敌草隆 diuron	49(7.0)	20(2.0)

虽然 CYP71A10 具有代谢 4 种除草剂的能力,但因产生的代谢物毒性的差异,转基因植物对除草剂表现的抗性有所不同。优草隆和敌草隆的 N-脱甲基代谢物,其毒性比其母体化合物毒性仅微弱降低,而 N-脱甲基利谷隆几乎没有除草活性。在对照植物中,绿麦隆也较大程度地被代谢,但经检测其代谢中间物主要是仍有毒性的 N-脱甲基的绿麦隆,而在转基因植物中,绿麦隆的代谢产物为无毒性的羟基化或双脱甲基化代谢物。



### 12.2.2.5 CYP105A1 在分子生物学研究和育种中的应用

*CYP105A1* 是土壤细菌 (*Streptomyces griseus*) 中编码 *P450sul* 的基因, 它是许多磺酰脲类除草剂的末端氧化酶 (O'keefe et al., 1988)。因其代谢中间物与植物中的酶相似, 常用于植物 P450 对除草剂代谢作用的模式系统。

*CYP105A1* 在烟草 (*Nicotiana tabacum*) 中的表达研究发现, 它的功能表达要求该 P450 靶向叶绿体的基质, 表明 P450 严格依赖于铁氧还蛋白。

酶活性测定和转基因植物的除草剂耐受性测定结果显示, 除草剂 (R7402) 被 *P450sul* N-脱烷基化作用产生的中间物比 R7402 本身毒性更高。具有 *P450sul* 活性的植物比无 *P450sul* 的植物更易受到 R7402 的毒害。

将 *P450sul* 在植物特定组织中表达, 可以将具有植物毒性的 R7402 中间体隔离在单一植物组织。如在烟草花药的绒毡层特异性表达 *P450sul*, 用 R7402 处理其未成熟的花芽, 可以降低花粉的活力, 达到化学雄性不变的目的, 为杂交种子的生产提供新的途径 (O'keefe et al., 1994)。

### 12.2.3 P450 在环境监测和保护中的作用

#### 12.2.3.1 P450 用作环境污染的指示剂

环境污染物可能抑制或诱导生物体 P450 酶系的活性。根据污染物浓度与酶活性的定量关系,可以预测环境污染的程度。

鱼肝的加单氧酶活性可以被许多化合物诱导,如多环芳烃(PAH), $\beta$ -萘黄酮(BNF)。极性氯代芳烃包括二噁英(TCDD)可以强烈诱导芳烃羟基化(AHH),7-乙氧试灵卤-O-脱乙基活性(EROD)和7-乙氧香豆素-O-脱乙基活性(ECOD)(Schenkman and Griem, 1993)。

在昆虫中,P450 酶系活性也因暴露于外源物质而变化,Sturm 和 Hansen(1999)报道摇蚊(*Chironomus riparius*)的 ECOD 和 EROD 活性,在接触浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{L}$  的 3,4-二氯苯胺中 4d 后,活性被抑制 30%,然而在萘的作用下,酶活性被诱导至对照的 1.3 倍。Miota 等(2000)报道了另一种摇蚊(*Chironomus tentant*)幼虫暴露在含阿特拉津(atrazine)的情况下,其艾氏剂环氧化活性上升,微粒体的 SDS-PAGE 电泳图谱中 45kDa 的蛋白带明显增强。

#### 12.2.3.2 细胞色素 P450 在生物除污中的应用

人类社会产生的有毒废物日益增多,迫切需要开发一种有效的途径以解毒或降解这些废物。特别是多环芳烃及多卤代有机物,它们的生物利用率低且在化学上是惰性的,成为环境污染治理的一大难题。P450 酶系可以通过羟基化、环氧化、脱烷基化、脱卤化氢等作用催化多种结构不同的物质,使许多类型的化合物的化学性质发生改变。人类创造的环境化合物,估计已超过 200 000 种,其中大多数可能是 P450 的底物。生物中的 P450 具有的降解外来物质特有的内在能力以及广泛不同的底物谱,在环境的生物除污应用中具有广阔的前景。

##### (1) 天然 P450 的利用

微生物 P450 无处不在,它们具有强的还原和氧化能力,对于环境的生物净化十分有用。近期的工作证明,天然存在的 P450 可以降解除草剂阿特拉津,硫代氨基甲酸酯以及卤代烷(Kellner *et al.*, 1997)。P450cam 是目前了解得最清楚的细胞色素 P450,它来源于假单孢菌,除具有烷烃羟基化活性以外,它还具有还原脱卤作用,如六氯乙烷和五氯乙烷经 P450cam 还原脱卤作用被分别转化为四氯乙烯和三氯乙烯(Li and Wackett, 1993)。六氯乙烷具有与该 P450 的天然底物(樟脑)相当的结合亲和力和囊互补性。P450cam 还具有氧化三氯乙烷和 1,2-二氯丙烷产生 1,1,1-三氯乙醇和氯丙酮的作用。

随着分离鉴定的 P450 数量的增加,人们还会发现许多具有“生物除污”意义的 P450。

##### (2) 工程化的 P450

1) 定点诱变产生的 P450 应用有关 P450 活性位点的研究成就,有可能重新设计 P450 的活性部位以结合和催化 P450 的非天然底物。P450 底物结合囊的细微改变,可以改变 P450 的底物特异性和催化效率,通过修饰 P450 酶可以用于特定的环境污染物的生物净化。

P450cam 活性部位氨基酸残基在控制酶的底物结合和氧化作用中的作用,已通过诱变的方法进行了研究。Loida 和 Sligar(1993)证明,将小分子的非天然底物如乙基苯限定在靠近血红素的 P450cam 突变体可以提高底物氧化作用的偶联效率,且各活性部位的突变效应是累加的。分子动力学模拟研究表明,通过 Phe87Trp 突变降低小分子如五氯乙烷在 P450cam 活性中心中的构象自由度,可以提高脱卤作用效率(Manchester and Omstein, 1995)。

Wong 及其同事发现,P450cam 的 1 个或 2 个活性位点的突变,可以改变其底物的特异性,他们得到的 P450cam Y96A 突变体具有氧化如二苯基甲烷这些不被天然 P450 酶氧化的物质。Y96A 以及 Y96F 起作用的区域和立体选择性也与野生种类不同。Y96A 突变体的底物结合囊具有更大的空间,表示它对底物的要求可能具有更大的可塑性(Jones *et al.*, 1996; England *et al.*, 1996)。

2) 随机诱变产生的 P450 除推理设计外,还可通过随机诱变的方法产生具有生物除污意义的新的 P450。这种方法的优点是可以迅速筛选出所希望表型的 P450,而无需先预测。对于 P450 结构未知的情况下,随机突变十分有用(Kellner *et al.*, 1997)。构建这种 P450 的一个新的技术是通过 DNA 改组(Stemmer, 1994a; 1994b)。DNA 改组优于传统的 PCR 或化学随机诱变,因为通过改组和筛选可以获得目的基因的多个突变(Kellner *et al.*, 1997)。这种方法类似于酶的自然进化即通过“突变→表型选择”循环来获得所需的基因。这一技术已用于提高绿荧光蛋白的荧光(Cramer *et al.*, 1996)。

3) 电子传统系统 P450 加单氧酶需要电子供体,这由电子传递系统提供。生物工程改造的 P450 以及天然 P450 在其非天然宿主中的活性表达,需要有效的电子传递系统。P450 用于生物净化的一个难题是在重组系统中难以获得有效的电子传递(Peterson and Prough, 1986)。一些研究组织正在研究还原酶与 P450 的相互作用,以寻找在非天然生物系统中获得有效电子传递的方法(Uvarov *et al.*, 1994; Shanker and Atkins 1996; Sibbesen *et al.*, 1996)。

Sibbesen 等(1996)报道了第一个异源表达的自给催化系统,他们利用短肽连接体产生了假单孢氧还蛋白还原酶-假单孢氧还蛋白-细胞色素 P450cam 三融合蛋白。这种三融合蛋白在大肠杆菌中表达具有氧化樟脑以及其他底物的活性,这表明在非天然宿主中可以产生具有活性的 P450 系统。

Shanker 和 Atkins(1996)用不含质粒的假单孢细菌中的 P450cam 与荧光酶素依赖的光还原作用相偶联建造了一个类似的具有催化活性的系统。由于还原脱卤作用需要两种蛋白的表达,因此这一实验证明,替代的电子传递源也可应用到 P450 中以达到生物除污的目的。

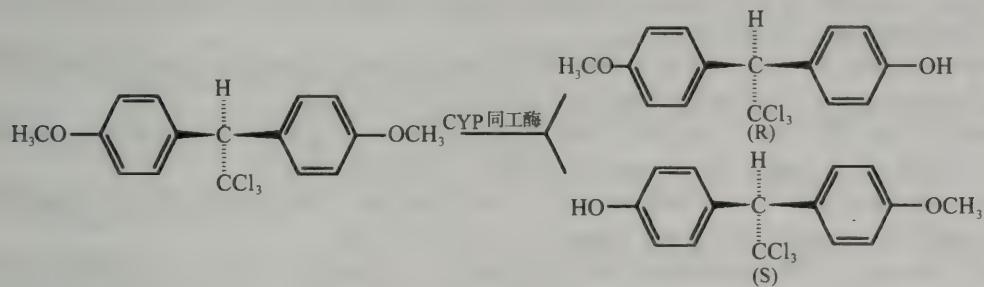
虽然通过基因工程的方法可以改变 P450 的代谢途径,但通常情况下,仅依赖 P450 的作用将多环芳烃及多卤代有机物等环境污染物完全生物降解是很困难的。简单的做法是把天然或基因工程的 P450 对目标污染物的生物转化作用作为生物除污整个过程的一部分,使 P450 作用的产物可被天然存在的其他生物作用途径吸收和降解。一个出色的例子是 Wackett 的工作(Wackett, 1995)。Wackett 构建了一个假单孢细菌系统可以表达 P450cam 催化五氯乙烷还原脱卤作用,该过程的产物可被甲苯双加单氧化酶氧化脱氯,这样可使五氯乙烷完全脱氯,最终变成 CO<sub>2</sub>。

随着认识和技术的进步,在不久的将来,人们完全可以设计出对特定靶标物质具有催化活力的 P450。计算机模拟、位点指导的诱变以及随机诱变方法已经为人们实现目标提供了有力的手段。重组非天然系统以完成电子传递可以优化生物除污系统。这些技术的有机结合为生物净化展现出诱人的发展前景。可以相信,通过利用对污染物高转化活性的工程 P450,与 P450 反应产物进一步降解的其他生物过程结合,可以加速污染物的生物除污进程(Wong, 1998)。

### 12.2.4 P450 在化学合成中的作用

有些 CYP 催化反应表现出产物和底物的立体选择性,利用这一性质可以将 P450 用于特异化学品的生产。

甲氧滴滴涕在哺乳动物体内,首先氧化脱单甲基生成手性单羟基化合物,对映体比率决定于反应条件。当在体外用苯巴比妥预处理大鼠时,则鼠肝微粒体氧化脱甲基作用发生急剧地变化,此变化依赖于底物的初浓度,因为底物为高疏水性和对各 P450 同工酶不同亲和性。Kishimoto 等(1995)曾报道微粒体 CYP 同工酶在甲氧滴滴涕的氧化脱甲基对映体的选择性。反应式如下:



反应中的微粒体 CYP 同工酶为经苯巴比妥预处理鼠肝微粒体中纯化得到的细胞色素 P450 的 4 种同工酶,为 P450 $\alpha$ (CYP2C6)、P450 $\beta$ (CYP2A1)、P450 $\gamma$ (CYP2B1)和 P450 $\delta$ (CYP2B2)。这些同工酶在甲氧滴滴涕氧化脱甲基作用中的参数和对映体的选择性见下表 12.6。

表 12.6 CYP 同工酶在甲氧滴滴涕脱甲基作用的参数和对映体的选择性  
(Kishimoto *et al.*, 1995)。

细胞色素 P450	$K_{m,\mu\text{M}}$	$V_{max} [\text{mol}/(\text{mol cyp} \cdot \text{min})]$	$V_{max}/K_m$	$(S)/[(S)+(R)]$
$\alpha$ (CYP2C6)	0.36	0.40	1.11	95~100
$\beta$ (CYP2A1)	0.38	0.36	0.95	95~100
$\gamma$ (CYP2B1)	1.07	1.20	1.12	36~40
$\delta$ (CYP2B2)	2.34	1.22	0.52	42~46
PB-微粒体(1% BSA)	0.85	1.07	1.25	
(2% BSA)	1.68	1.04	0.62	

上述同工酶对甲氧滴滴涕作为底物,至少有两种特征:一为低对映体选择性和低底物亲和性;另一种为高选择性和高亲和性。从上表中可以看出 Cyp 同工酶中, CYP2C6 和

2A1 表现为高选择性和高亲和性,而 CYP2B1 和 2B2 的对映体选择性和底物亲和性都较低。

在甲氧滴滴涕的氧化脱甲基反应中,所用的是 CYP2B1 和 2C6 同工酶(1:1)的重组系统与浓度不同的底物作用,其代谢物对映体选择性的变化决定于底物的浓度。如底物浓度低时,所形成 S-对映体约为 75%,底物浓度高时,此比率减低为 55%。因每个同工酶对同一个底物进行代谢作用时,它们之间的  $K_m$  和  $V_{max}$  参数以及对映体选择性等都可能不同(Kishimoto *et al.*, 1995)。

### 参 考 文 献

瞿礼嘉,顾红雅,胡苹等. 1998. 现代生物技术导论. 北京:高等教育出版社, 254~285

Arnold E H. 1998. Design by directed evolution. *ACC. Chem. Res.*, 31: 125~131

Auchus R J, Lee T C, Miller W L. 1998. Cytochrome P450 C17 without direct electron transfer. *J. Biol. Chem.*, 273: 3158~3165

Bak S, Kahn RA, Nielsen HL *et al.* 1998. Cloning of three A-type cytochrome P450, CYP71E1, CYP98 and CYP99 from *Sorghum bicolor*(L.) Moench by a PCR approach and identification by expression in *Escherichia coli* of CYP71E1 as a multifunctional cytochrome P450 in the biosynthesis of the cyanogenic glucoside dhurrin. *Plant Molecular Biology*, 36: 393~405

Bertz R J, Granneman G R. 1997. Use of *in vivo* data to estimate the likelihood of metabolic pharmacokinetic interactions. *Clin Pharmacokinet.*, 32: 210~258

Boobis A R, Sesardic D, Murray BP *et al.* 1990. Specied variation in the response of the cytochrome P450-depedent monooxygenase system to inducers and inhibitors. *Xenobiotica*, 20: 1139~1161

Chang TK, Weber GF, Crespi CL *et al.* 1993. Differential activation of cyclophosphamide and ifosfamide by cytochromes P-450 2B and 3A in human liver microsomes. *Cancer Res.*, 53(23):5629~5637

Chen L, Waxman DJ, Chen D *et al.* 1996. Sensitization of human breast cancer cells to cyclophosphamide and ifosfamide by transfer of aliver cytochrome P450 gene. *Cancer Res.*, 56(6):1331~1340

Chen L, Waxman DJ. 1995. Intratumoral activation and enhanced chemotherapeutic effect of oxazaphosphorines following cytochrome P-450 gene transfer: development of a combined chemotherapy/cancer gene therapy strategy. *Cancer Res.*, 55(3):581~589

Chen L, Yu LJ, Waxman DJ. 1997. Potentiation of cytochrome P450/cyclophosphamide-based cancer gene therapy by co-expression of the P450 reductase gene. *Cancer Res.*, 57(21): 4830~4837

Chen X, Li Y, Xiong K *et al.* 1998. Cancer gene therapy by direct tumor injections of a nonviral T7 vector encoding a thymidinekinase gene. *Hum Gene Ther.*, 9(5): 729~736

Crameri A, Whitehorn EA, Tate E, Stemmer WPC. 1996. Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuttling. *Nat. Biotechnol.*, 14: 315~319

De Vetten N, ter Horst J, Van Schaik HP *et al.* 1999. A cytochrome b<sub>5</sub> is required for full activity of flavonoid 3',5' hydroxylase, a cytochrome P450 involved in the formation of blue flower colours. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96:778~784

Doerfler W. 1996. A new concept in(adenoviral) oncogenesis: integration of foreign DNA and its consequences. *Biochim Biophys Acta*, 1288(2):F79~99

Dupont C, Spagnoli R, Degryse E *et al.* 1998. Self-sufficient biosynthesis of pregnenolone and progesterone in engineered yeast. *Nature Biotechnology*, 16: 186~189

Edwards R, Owen W J. 1989. The comparative metabolism of the S-triazine herbicides atrazine and terbutryne in suspension cultures of potato and wheat. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 34: 246~254

Egland PA, Rounch DA, Westlake ACG *et al.* 1996. Aliphatic vs aromatic C-H bond activation of phenylcyclohexane catalysed by cytochrome P450cam. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 357~358

Estabrook RW, Faulkner KM, Shet MS *et al.* 1996. Application of electrochemistry for P450-catalyzed reactions methods. *Method in Enzymology*, 272:44~51

Faulkner KM, Shet MS, Estabrook RW *et al.* 1995. Electrocatalytically driven  $\omega$ -hydroxylation of fatty acids using cytochrome P4504A1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:7705~7709

Fisher CW, Shet MS, Estabrook RW. 1996. Construction of plasmids and expression in *Escherichia coli* of enzymatically active fusion proteins containing the heme-domain of a P450 linked to NADPH-P450 reductase. *Methods Enzymol*, 272:15~25

Fitzsimmons SA, Workman P, Grever M *et al.* 1996. Reductase enzyme expression across the National Cancer Institute Tumor cell line panel: correlation with sensitivity to mitomycin C and EO9. *J Natl Cancer Inst.*, 88(5): 259~269

Fowler SM, England PA, Westlake ACG *et al.* 1994. Cytochrome P450cam monooxygenase can be redesigned to catalyse the regioselective aromatic hydroxylation of diphenylmethane. *J. Chem. Soc. Chem. Commun*, 2761~2762

Friedberg T, Wolf C R. 1996. Recombinant DNA technology as an investigative tool. I: drug metabolism research. *Adv Drug Del Rev*, 22:187~213

Friedberg T, Pritchard M P, Bandera M *et al.* 1999. Merits and Limitation of recombinant models for the study of human P450-mediated drug metabolism and toxicity: An Intralaboratory comparison. *Drug. Metabolism Rev.*, 31(2): 523~544

Gonzalez F P, Kerzekwa K R. 1995. Cytochromes P450 expression systems. *Annu Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 35: 369~390

Gonzalez F P. 1989. The molecular biology of cytochrome P450s. *Pharmacol. Rev.*, 40: 243~289

Gonzalez F J. 1992. Human cytochromes P450: problems and prospects. *Trends Pharmacol Sci.*, 13(9):346~352

Guryev O, Gilevich S. 1993. In "Abstracts" of the 8th international conference on cytochrome P450, Lisbon, Portugal (MC, Lechner, ed.), P172. John Libbey Eurotext Paris

Henriksen A. 1998. Structural interaction between horseradish Peroxidase C and the substrate benzhydroxamic acid determined by X-ray crystallography. *Biochem.*, 37: 8054~8060

Holton T A, Brugliera F, Lester DR *et al.* 1993. Coloring and expression of cytochrome P450 genes controlling flower color. *Nature*, 366: 276~279

Inui H, Ueyama Y, Shiota N *et al.* 1999. Herbicide Metabolism and Cross-Tolerance in Transgenic potato Plants Expressing Human CYP1A1. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 64:33~46

Inui H, Shiota N, Ishige T *et al.* 1998. Herbicide metabolism and resistance of transgenic potato plants expressing rat cytochrome P4501A1. *Breeding Sci*, 48: 135~143

Ito K, Iwatsubo T, Kanamitsu S *et al.* 1998. Quantitative prediction of in vivo drug clearance and drug interactions from in vitro data on metabolism, together with binding and transport. *Annu Rev Pharmacol. Toxicol.*, 38:461~499

Iwata H, Fujita K, Kushida H *et al.* 1998. High catalytic activity of human cytochrome P450 coexpressed with human NADPH-cytochrome P450 reductase in *Escherichia coli*. *Biochem Pharmacol.*, 55:1315~1325

Jones N E, England PA, Rouch DA. *et al.* 1996. Engineering the selectivity of aliphatic C-H bond oxidation catalysed by cytochrome P450cam. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 2413~2414

Joo H, Lin Z, Arnold FH. 1999. Laboratory evolution of peroxide-mediated cytochrome P450 hydroxylation. *Nature*, 399: 670~673

Jounaidi Y, Hecht JE, Waxman DJ. 1998. Retroviral transfer of human cytochrome P450 genes for oxazaphosphorine-based cancer genetherapy. *Cancer Res.*, 58(19):4391~4401

Jung W, Yu O, Lau SM *et al.* 2000. Identification and expression of isoflavone synthase, the key enzyme for biosynthesis of isoflavones in legumes. *Nat Biotechnol*, 18(2):208~212

Kellner DG, Maves SA, Sligar SG. 1997. Engineering cytochrome P450s for bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology*, 8:274~278

Kim GT, Tsukaya H, Uchimiya H. 1998. The ROTUNDIFOLIA3 gene of *Arabidopsis thaliana* encodes a new member of the cytochrome P-450 family that is required for the regulated polar elongation of leaf cells. *Genes Dev.*, 12: 2381~

2391

Kim GT, Tsukaya H, Saito Y *et al.* 1999. Changes in the shapes of leaves and flowers upon over-expression of cytochrome P450 in *Arabidopsis*. *Pro. Natl. Acad. Sci. USA*, 96: 9433~9437

Kishimoto D, Oku A, Kurihara N. 1995. Enantiopic Selectivity of Cytochrome P450-Catalyzed Oxidative Demethylation of Methylchlor: Alteration of Selectivity Depending on Isozymes and Substrate Concentration. *Pesti. Biolchem. Physiol.*, 51:12~19

Kroon J, Souer E, de Graaff A *et al.* 1994. Cloring and structural analysis of the anthocyanin pigmentation locus Rt of *Petunia hybride*: Characterisation of insection sequences in two mutant alleles *Plant J.*, 5: 69~80

Lamb SB, Lamb D C, Kelly S L, Stuckty D C. 1998. Cytochrome P450 immobilization as a route to bioremediation/bio-catalysis *FEBS Letters*, 431:343~346

Lewis AD, Lau DH, Duran GE *et al.* 1992. Role of cytochrome P-450 from the human CYP3A gene family in the potentiation of morpholinodoxorubicin by human liver microsomes. *Cancer Res.*, 52(16):4379~4384

Li J H, Lu A Y. 1997. Role of pharmacokinetics and metabolism in drug discovery and development. *Pharmacol. Rev.*, 49: 403~449

Li S, Wackett L P. 1993. Reductive dehalogenation by cytochrome P450cam: substrate binding and catalysis *Biochemistry*, 32: 9355~9361

Lin Z, Thorsen T, Arnold EH. 1999. Functional expression of horserodish peroxidase in *Escherichia coli* by directed evolution. *Biochem. Prog.*, 15: 467~471

Loberman S, Prasad VV. 1990. Heterodox notions on pathways of sterpidogenesis. *Endocr. Rev.*, 11:469~493

Loida P J, Sligar S G. 1993. Molecular recognition in cytochrome P450: Mechanism for the control of uncoupling reactions. *Biochemistry*, 32: 11530~11538

Mahato SB, Garai S. 1997. Advances in microbial steroid biotransformation. *Steroids*, 62: 332~345

Manchester J I, Omstein R L. 1995. Enzyme-catalyzed dehalogenation of pentachlorothane: why F87W-cytochrome P450cam is faster than wild-type. *Protein Eng.*, 8:801~807

Manome Y, Wen PY, Chen L *et al.* 1996. Gene therapy for malignant gliomas using replication incompetent retroviral and adenoviral vectors encoding the cytochrome P450 2B1 gene together with cyclophosphamide. *Gene Ther.*, 3(6):513~520

Masimirembwa CM, Otler C, Berg M *et al.* 1999. Heterologous expression and kinetic characterization of human cytochrome P450: Validation of a pharmaceutical tool for drug metabolism research *Drug. Metabolism and Disposition*, 27(10):1117~1122

Maves SA, Ueon H, Mclean MA *et al.* 1997. Decreased substrate affinity upon alteration of the substrate-docking region in cytochrome P450<sub>BM-3</sub> *FEBS Lett.*, 414:213~218

Meyer K, Shirley A M, Cusumano J C *et al.* 1998. Lignin monomer composition is determined by the expression of a cytochrome P450-dependent monooxygenase in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 6619~6623

Miller WL. 1988. Molecular biology of steroid hormone synthesis. *Endocr. Rev.*, 9:295~318

Miota F, Siegfried BD, Scarg ME, Lydy MJ. 2000. Atrazine induction of cytochrome P450 in *Chironomus tentans* larvae. *Chemosphere*, 40(3): 285~291

Mol J, Chornish E, Mason J *et al.* 1999. Novel coloured flowers. *Current Opinion in Biotechnology*, 10: 198~201

Murray GI, Taylor MC, McFadyen MC *et al.* 1997. Tumor-specific expression of cytochrome P450 CYP1B1. *Cancer Res.*, 57(14):3026~3031

Murray GI, Weaver RJ, Paterson PJ *et al.* 1993. Expression of xenobiotic metabolizing enzymes in breast cancer. *J Pathol.*, 169(3):347~353

Nahrstedt A. 1985. Cyanogenic glucosides as protecting agents for organisms. *Plant Syst Evol.*, 150:35~47

Nelson DR, Koymans L, Kamataki T *et al.* 1996. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics*, 6:1~42

Ohkawa H, Imaidhi H, Shiota H *et al.* 1998. Molecular Mechanisms of Herbicide Resistance with Special emphasis on Cy-

tochrome P450 Monooxygenases. *Plant Biotechnology*, 15(4):173~176

O'keefe DP, Romesser JA, Leto KJ. 1988. Identification of constitutive and herbicide inducible cytochrome P450 in *Streptomyces griseolus*. *Arch. Microbiol.*, 149:406~412

O'keefe DP, Tepperman JM, Dean C et al. 1994. Plant expression of a Bacterial cytochrome P450 that catalyzes activation of a sulfonylurea Pro-Herbicide. *Plant Physiol.*, 105:473~482

Ono S, Hatanaka T, Hotta H et al. 1996. Specificity of substrate and inhibitor probes for cytochrome P450s: Evaluation of in vitro metabolism using cDNA-expressed human P450s and human liver microsomes. *Xenobiotica*, 26:681~693

Parikh A, Gillam E MJ, Guengerich F P. 1997. Catalysis of reactions important in drug metabolism by *Escherichia coli* expression human cytochromes P450. *Nat Biotechnol.*, 15:784~788

Parkinson A. 1996. An overview of current cytochrome P450 technology for assessing the safety and efficacy of new materials. *Toxicol. Pathol.*, 24:45~57

Pawelek JM, Low KB, Bermudes D. 1997. Tumor-targeted *Salmonella* as a novel anticancer vector. *Cancer Res.*, 57(20):4537~4544

Pearce R E, McIntyre C J, Madan A et al. 1996. Effects of freezing, thawing and storing human liver microsomes on cytochrome P450 activity. *Arch Biochem Biophys.*, 331: 145~169

Penning T M. 1997. Molecular endocrinology of hydroxysteroid dehydrogenases. *Endocr. Rev.*, 18:281~305

Peterson J A, Prough R A. 1986. Cytochrome P450 reductase and cytochrome b5 in cytochrome P450 catalysis. In: *Cytochrome P450 Structure, Mechanism and Biochemistry*, Ortiz de Montellano P R (ed). New York and London: Plenum Press., 89~113

Pompon D, Louerat B, Bronine A et al. 1996. Heterologous expression of P450s. In: Waterman MR Johson E F(eds.) *Methods in Enzymology*, Vol. 272, Academic Press, San Diego CA. 51~64

Prentis R A, Lis Y, Walker S R. 1988. Pharmaceutical innovation by the seven UK-owned pharmaceutical companies (1964~1985). *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 25:387~396

Reipa V, Mayhew MP, Vilker VL. 1997. A direct electrode-driven P450 cycle for biocatalysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 13554~13558

Ren S, Yang JS, Kalhorn TF et al. 1997. Oxidation of cyclophosphamide to 4-hydroxycyclophosphamide and deschloroethylcyclophosphamide in human liver microsomes. *Cancer Res.*, 57(19):4229~4235

Rendic S, Carlo FJD. 1997. Human cytochrome P450 enzymes: A status report summarizing their reactions, substrates, inducers and inhibitors. *Drug Metab. Rev.*, 29:413~580

Roslin H. 1988. Toxicity and food security: a review of the health effects of cyanide exposure from cassava and way to prevent these effects. 1~40. United Nations:UNICEF

Schenkman JB, Griem H, eds. 1993. *Handbook of Experimental Pharmacology*. Berlin Springer-Verlag , 476

Schuetz EG, Beck WT, Schuetz JD. 1996. Modulators and substrates of p-glycoprotein and cytochrome P450 3A coordinately up-regulate these proteins in human colon carcinoma cells. *Mol Pharmacol.*, 49(2):311~318

Scott J G. 1996. Inhibitors of CYP6D1 in house fly microsomes. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 26: 645~649

Shanker R, Atkins W M. 1996. Luciferase-dependent cytochrome P450-catalyzed dehalogenation in genetically engineered *Pseudomonas*. *Biotechnol. Prog.*, 12:474~479

Sheldon R. 1999. Enzymes Picking a Winner. *Nature*, 399: 636~637

Shet MS, Fisher CW, Holmans PL et al. 1993. Human cytochrome P450 3A4: enzymatic properties of a purified recombinant fusion protein containing NADPH-P450 reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 11748~11752

Shiota N, Inui H, Ohkawa H. 1996. Metabolism of the herbicide chlortoluron in transgenic tobacco plants expressing the fused enzyme between rat cytochrome P4501A1 and yeast NADPH-cytochrome P450 Oxidoreductase Pestic. *Biochem. Physiol.*, 54: 190~198

Sibbesen O, Devoss JJ, Ortiz de Montellano PR. 1996. Putidaredoxin reductase-putidaredoxin-cytochrome P450cam triple fusion protein. *J. Biochem.*, 271:22462~22469

Siminnszky B, Corbin FT, Ward ER et al. 1999. Expression of a soybean cytochrome P450 monooxygenase cDNA in yeast

and tobacco enhance the metabolism of phenylurea herbicides. *Proc. Acad. Sci. USA*, 96:1750~1755

Sladek NE. 1988. Metabolism of oxazaphosphorines. *Pharmacol Ther.*, 37(3):301~355

Stemmer WPC. 1994a. Rapid evolution of protein *in vitro* by DNA shuttling. *Nature*, 370:389~391

Stemmer WPC. 1994b. DNA shuttling by random fragmentation and reassembly: *in vitro* recombination for molecular evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 10747~10751

Sturm A, Hansen P. 1999. Altered cholinesterase and monooxygenase levels in *Daphnia magna* and *Chironomus riparius* exposed to environmental pollutants. *Ecotoxicol. Environ. Safe.*, 42(1):9~15

Tsuge T, Tsukaya H, Uchimiya H. 1996. Two independent and polarized processes of cell elongation regulate leaf blade expansion in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Development* (Cambridge, UK.), 122: 1589~1600

Uvarov V Y, Shumyantseva V V, Byknovskaya E A *et al.* 1994. Semi-artificial hydroxylating enzymes created by flavins binding to cytochrome P4502B4 and by bleomycin binding to NADPH-cytochrome P450 reductase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 200: 722~725

Wackett L P. 1995. Recruitment of co-metabolic enzymes for environmental detoxification of organohalides. *Environ. Health Perspect*, 103: 45~48

Waxman DJ, Chen L, Hecht JED *et al.* 1999. Cytochrome P450-based cancer gene therapy: recent advances and future prospects. *Drug. Metab. Rev.*, 31(2):503~522

Waxman DJ, Morrissey JJ, Leblanc GA. 1989. Hypophysectomy differentially alters P-450 protein levels and enzyme activities in rat liver: pituitary control of hepatic NADPH cytochrome P450 reductase. *Mol Pharmacol.*, 35(4):519~525

Weber GF, Waxman DJ. 1993. Activation of the anti-cancer drug ifosfamide by rat liver microsomal P450 enzymes. *Biochem Pharmacol.*, 45(8):1685~1694

Wei MX, Tamiya T, Chase M *et al.* 1994. Experimental tumor therapy in mice using the cyclophosphamide-activating cytochrome P450 2B1 gene. *Hum Gene Ther.*, 5(8):969~978

Wollenberger U, Jung C, Scheller FW. 2000. Clay-bridged Electron Transfer between Cytochrome P450cam and Electrode. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 268(3):740~744

Wong L L, Westlake A C G, Nickerson D P. 1997. Protein engineering of cytochrome P450 structure Bonding. , 88:175~207

Wong L-L. 1998. Cytochrome P450 monooxygenases. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2: 263~268

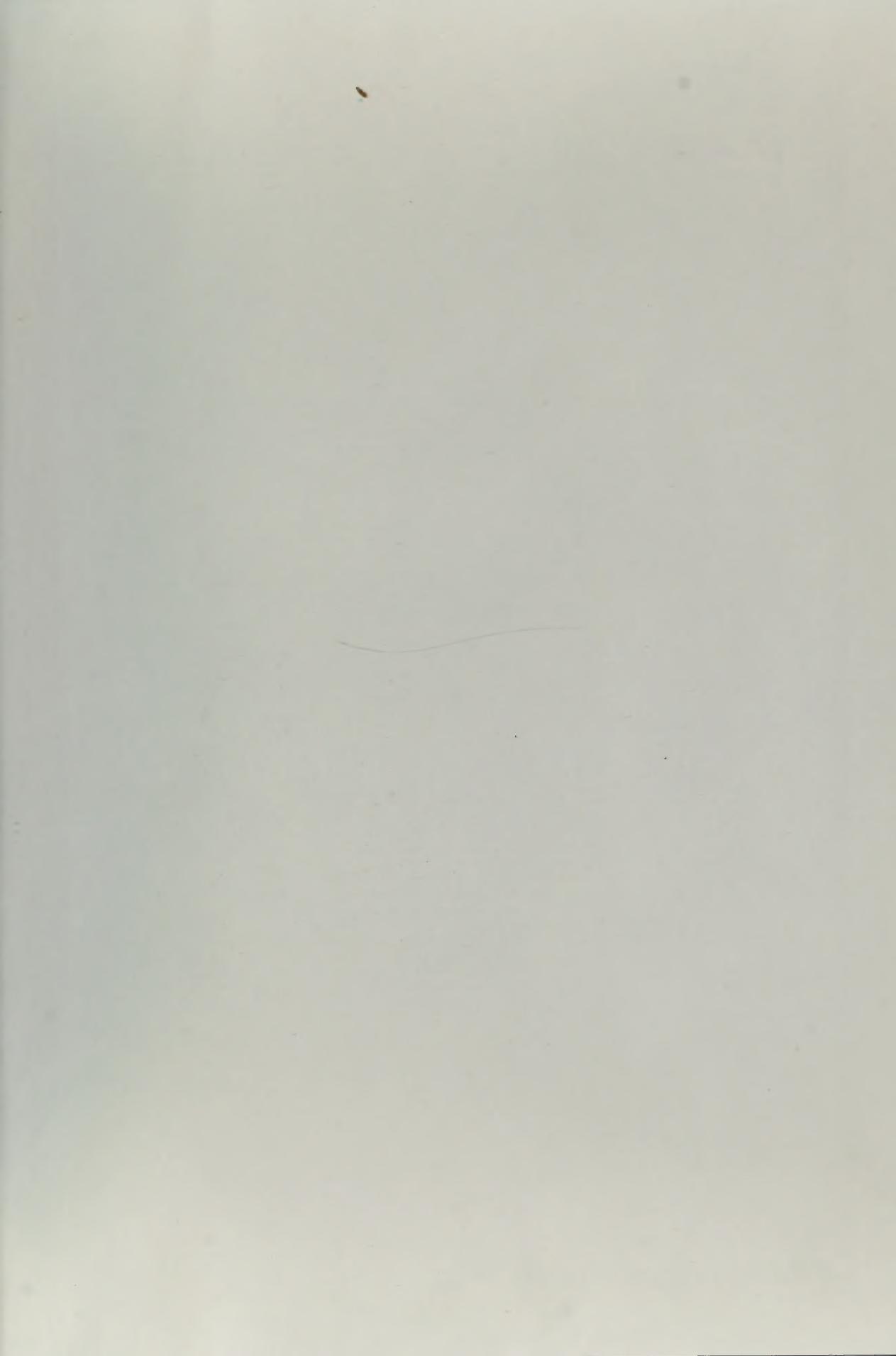
Wood G F. 1975. Chemical and microbiological transformation of steroids, 5~10 in Steroid immuno assay. Cameron E H, *et al.* (ed.). UK:Alpha Omega Cardiff

Woods G F. 1975. Chemical and microbiological transformation of steroids. 5~10 in steroid immunoassay Cameron E H, *et al.* (ed.)Alpha Omega, UK:Cardiff

Workman P, Stratford IJ. 1993. The experimental development of bioreductive drugs and their role in cancer therapy. *Cancer Metastasis Rev.*, 12(2):73~82

Yamazaki H, Gillam EMJ, Dong MS *et al.* 1997. Reconstitution of recombinant cytochrome P450 2C10(2C9) and comparison with cytochrome P4503A4 and other forms: effects of cytochrome P450-P450 and cytochrome P450-b5 interactions. *Arch Biochem Biophys*, 342:329~337

Zhou-Pan XR, Seree E, Zhou XJ *et al.* 1993. Involvement of human liver cytochrome P450 3A in vinblastine metabolism: drug interactions. *Cancer Res.*, 53(21):5121~5126



收 到 期	2004.5.18
来 源	人 天
书 价	45.00 元
单据号	
开票日期	

中科院植物所图书馆



S0003522

000027844

58.174359

248

2001.5

细胞色素P450酶系的结构、功能与

借者单位	借者姓名	借出日期	还书日期
------	------	------	------

10月28日

2004.12.24

58.174359

248

000027844

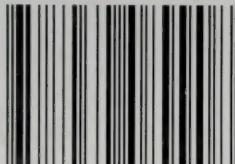
100-100-100

责任编辑：霍春雁 李 锋

封面设计：高海英

# 细胞色素 P450 酶系的结构、功能与应用前景

ISBN 7-03-008990-1



9 787030 089908 >

ISBN 7-03-008990-1/Q · 1026

定 价：45.00 元